

DUMITRU BUIUC  
doctor în medicină  
șef de lucrări

Cobzeanu N. Mihail  
an II, sem. 4, 2011  
GABRIELA COMAN  
doctor în medicină  
asistent

Disciplina de Microbiologie,  
Facultatea de Medicină,  
I.M.F. Iași

Microbi

BACTERIOLOGIA PRACTICA  
UN GHID ÎN STUDIUL ȘI PRACTICA  
MEDICINII

Ediția a VI-a

INSTITUTUL DE MEDICINA ȘI FARMACIE IASI

1977



Editia I-a 1951  
Editia II-a 1956  
Editia III-a 1959  
Editia IV-a 1964  
Editia V-a 1974



## PREFATA la ediția a VI-a

Utilizarea rațională a laboratorului de microbiologie și sero-imunologie clinică, ca instrument de investigație la dispoziția medicului practician, este un atribut al competenței profesionale.

Laboratorul nu este un auxiliar ci o parte integrantă, indispensabilă, a medicinei clinice și a medicinei preventive. Acesta este sensul în care trebuie înțelese cuvintele lui Charles Richet:

"Ceux qui opposent le laboratoire à la clinique, n'ont jamais rien compris ni à l'un ni à l'autre"

Ediția de față, prin conținutul și suita capitolelor sale, are în vedere programa analitică și, mai ales, necesitatea îndrumării studentului în medicină pe calea înțelegerii raționale a posibilităților pe care i le oferă laboratoarele de microbiologie clinică și de microbiologie sanitară în activitatea curativă și în cea profilactică.



## II

Studentul, viitorul medic, trebuie să cunoască în final ce poate să ceară laboratoarelor de microbiologie și sero-imunologie, cum și când să le solicite și cum să interpreteze datele pe care le obține pe această cale.

Pornim de la ideea că studentul în medicină trebuie convins din primii ani că studiul medicinei nu începe și nu se sfârșește cu o disciplină sau alta, că un examen nu este decât o etapă spre studiul unor noi noțiuni sau a aceluiași noțiuni la un nivel mai complex, superior, studiu pe care, progresiv, trebuie să se deprindă a-l efectua independent pornind de la problemele pe care i le ridică activitatea de zi cu zi la patul bolnavului. Tocmai de aceea am dat dezvoltare mai mare unor capitole incluzând, dactilografiate cu caractere distincte, acele noțiuni facultativ de reținut pentru studenții anului II, dar asupra cărora studenții din anii superiori vor putea reveni cu folos pe parcursul stagiilor clinice și chiar în cursul primilor ani de practică medicală, indiferent de specialitatea aleasă.

Autorii consideră cartea de față ca o modestă contribuție la ilustrarea practică a magistralelor .



### III

cursuri ale tov.prof. Eugenia Ducea, promotor necesitat în școala medicală ieșeană a unei concepții clare și realiste asupra domeniului atât de spinos al Microbiologiei Clinice.

Iasi 2 octombrie 1976

Dumitru Buino  
Gabriela Coman



# C U P R I N S

## PARTEA INTIIA    CONDITII GENERALE PENTRU STUDIUL MICROBIILOR

- 1 Sterilizarea (Dr. D.Buiuc), 1

## PARTEA A DOUA    A. METODE DE EVIDENTIERE A BACTERIILOR

- 2 Evidențierea bacteriilor prin examen microscopic. Caractere morfologice și colorabilitate (Dr. D.Buiuc), 32
- 3 Cultivarea bacteriilor. Izolarea în culturi pure (Dr. D.Buiuc), 46

### B. IDENTIFICAREA BACTERIILOR. TEHNICI GENERALE

- 4 Cercetarea caracterelor fiziologice ale bacteriilor (Dr. D.Buiuc), 64
- 5 Animalele de laborator în investigația bacteriologică (Dr. D.Buiuc), 72

## PARTEA A TREIA    REACTII ANTIGEN-ANTICORP

- 6 Cercetarea structurii antigenice a bacteriilor (Dr. D.Buiuc), 85
- 7 Cercetarea anticorpilor la bolnav (Dr. D.Buiuc), 98

## PARTEA A PATRA    METODE DE LABORATOR IN CONDUCEREA ANTIBIOTERAPIEI

- 8 Determinarea sensibilității bacteriilor la antibiotice (antibiograma) (Dr. D.Buiuc), 116
- 9 Cercetarea antibioticelor în umori în cursul antibioterapiei (Dr. D.Buiuc), 127



PARTEA A CINCEA IDENTIFICAREA PRINCIPALELOR  
BACTERII IMPLICATE IN PATOLOGIA  
INFECTIOASA

- 10 Identificarea cocilor gram-pozitivi așezați în grămezi (Dr. D.Buiuc), 133
- 11 Identificarea cocilor gram-pozitivi așezați în lanțuri (Dr. D.Buiuc), 139
- 12 Identificarea cocilor gram-negativi (Dr. D.Buiuc), 153
- 13 Identificarea bacililor intestinali gram-negativi facultativ anaerobi (Dr. D.Buiuc), 160
- 14 Identificarea bacililor gram-negativi nefermentativi (Dr. D.Buiuc), 178
- 15 Identificarea cocobacililor gram-negativi aerobi sau facultativ anaerobi (Dr. D.Buiuc), 181
- 16 Identificarea bacililor gram-pozitivi aerobi nesporulați (Dr. D.Buiuc), 191
- 17 Identificarea bacililor gram-pozitivi sporulați aerobi (Dr. Gabriela Coman), 199
- 18 Identificarea bacililor gram-pozitivi sporulați anaerobi (Dr. Gabriela Coman), 203
- 19 Identificarea bacililor gram-negativi anaerobi (Dr. Gabriela Coman), 207
- 20 Identificarea bacililor gram-pozitivi nesporulați anaerobi (Dr. Gabriela Coman), 210
- 21 Identificarea bacililor acido-alcoolo-rezistenți (Dr. Gabriela Coman), 213
- 22 Identificarea spirochetelor (Dr. D.Buiuc), 220



- 23 Identificarea micoplasmelor (Dr. Gabriela Coman), 226

PARTEA A SASEA DIAGNOSTICUL ETIOLOGIC AL PRINCIPALELOR INFECTII BACTERIENE

- 24 Principii de bază în recoltarea și transportul probelor destinate examenului bacteriologic și serologic (Dr. D.Buiuc), 229
- 25 Examele bacteriologic și seroimunologic în bolile infecțioase (Dr. D.Buiuc), 244
- 26 Hemocultura în diagnosticul infecției (Dr. D.Buiuc și Dr. Gabriela Coman), 257
- 27 Examenul bacteriologic al puroiului (Dr. D.Buiuc), 267
- 28 Diagnosticul bacteriologic al meningitelor. Examenul bacteriologic al lichidului cefalo-rahidian (Dr. D.Buiuc), 277
- X 29 Diagnosticul bacteriologic al infecțiilor căilor urinare (Dr. D.Buiuc), 287
- X 30 Diagnosticul bacteriologic al infecțiilor căilor respiratorii superioare (Dr. D.Buiuc), 299
- 31 Diagnosticul bacteriologic al infecțiilor căilor respiratorii inferioare. Examenul bacteriologic al sputei (Dr. D.Buiuc), 311
- 32 Diagnosticul bacteriologic al infecțiilor intestinale și toxinfecțiilor alimentare. Examenul bacteriologic al materiilor fecale (Dr. D.Buiuc), 322
- 33 Diagnosticul bacteriologic al infecțiilor căilor genitale la femeie (Dr. Gabriela Coman), 333
- Anexă, 340



# 1 STERILIZAREA

Steril, din punct de vedere microbiologic, înseamnă lipsit total de microbi.

Sterilizarea constă în omorîrea sau îndepărtarea tuturor microorganismelor - patogene sau nepatogene, forme vegetative și spori - dintr-o substanță sau de pe suprafața unui obiect.

Manipularea produselor microbiene în scopul evidențierii microbilor și a identificării lor ș.a. sînt de neconceput în lipsa unei sterilizări eficiente a instrumentelor, a recipientelor, a mediilor de cultură.

Dar sterilizarea are nenumărate aplicații și în activitatea medicală și umană în general. Ea reprezintă o condiție majoră a

(1) terapiei privind atît

- medicamentul, indiferent de forma sa, dar în special soluțiile injectabile, cît și

- întregul utilaj chirurgical, instrumentar, fire de sutură, comprese, pansamente, aerul sălii de operație, îmbrăcămintea chirurgului etc.;



(ii) profilaxiei infecției atât în condiții de spital cât și în condițiile vieții de toate zilele:

- sterilizarea produselor patologice provenite de la bolnavul infecțios;
- sterilizarea obiectelor contaminate folosite de bolnavul infecțios și a încăperii în care s-a găsit acesta;
- noțiunea se extinde, în măsura posibilului, la sterilitatea alimentului, apei de băut, lenjeriei etc.

Pentru aceste motive am dat capitolului o amploare mai mare.

Sterilizarea se obține prin:

(A) Agenți fizici

(1) căldură

(a) căldură uscată

(b) căldură umedă

(2) filtrare

(3) radiații

(B) Agenți chimici: substanțe antimicrobiene.

Alegerea metodei de sterilizare este dictată de natura materialelor care urmează a fi sterilizate. Acestea, în condițiile unei sterilizări eficiente, nu trebuie să se degradeze sub acțiunea agentului de sterilizare. Excepție fac, bineînțeles, reziduurile în cazul cărora se urmărește exclusiv eficiența sterilizării.



## Metode de sterilizare

(1) Sterilizarea prin căldură este cel mai larg folosită în practica medicală.

(a) S t e r i l i z a r e a p r i n c ă l d u r ă u s c a t ă

(i) Sterilizarea prin ardere este rapidă și are eficiență absolută. Se pot steriliza prin ardere obiecte cu volum mic care se răcesc repede și se întrebuintează imediat după sterilizare.

a) Incălzirea la roșu: obiectul de sterilizat se arde în flacără (bec de gaz, lampă de spirt) până la roșu. Se sterilizează în acest mod firul, ansa și spatula de platină (fig.1).

b) Flambarea: obiectul de sterilizat se trece prin flacără timp de câteva secunde. Se sterilizează în acest mod capilarul pipetelor Pasteur, gura eprubetelor și flacoanelor (sterile în interior), lame de sticlă, tija ansei și spatulei (fig.2).

Aceste metode sînt contraindicate pentru sterilizarea altor instrumente metalice (ace de seringă din oțel, bisturie, pense, foarfeci etc.) deoarece le degradează.

c) Prin incinerare se pot steriliza reziduurile contaminate (pansamente, comprese, gunoiul menajer).



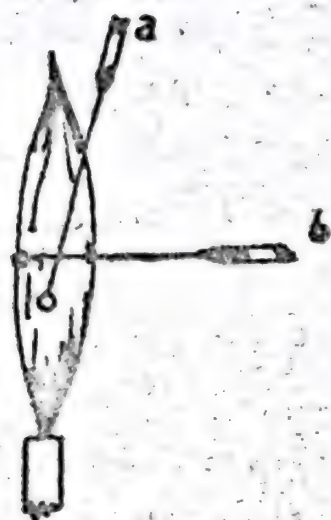


Fig.1 Sterilizarea anse  
sei prin ardere la roșu  
a) poziție corectă,  
b) poziție incorectă

(ii) Sterilizarea prin aer cald. Este indicată pentru obiecte de sticlă (eprubete, flacoane, cutii Petri, pipete etc.), de porțelan (mojare, capsule), instrumentarul chirurgical metalic, seringile în întregime din sticlă (tip

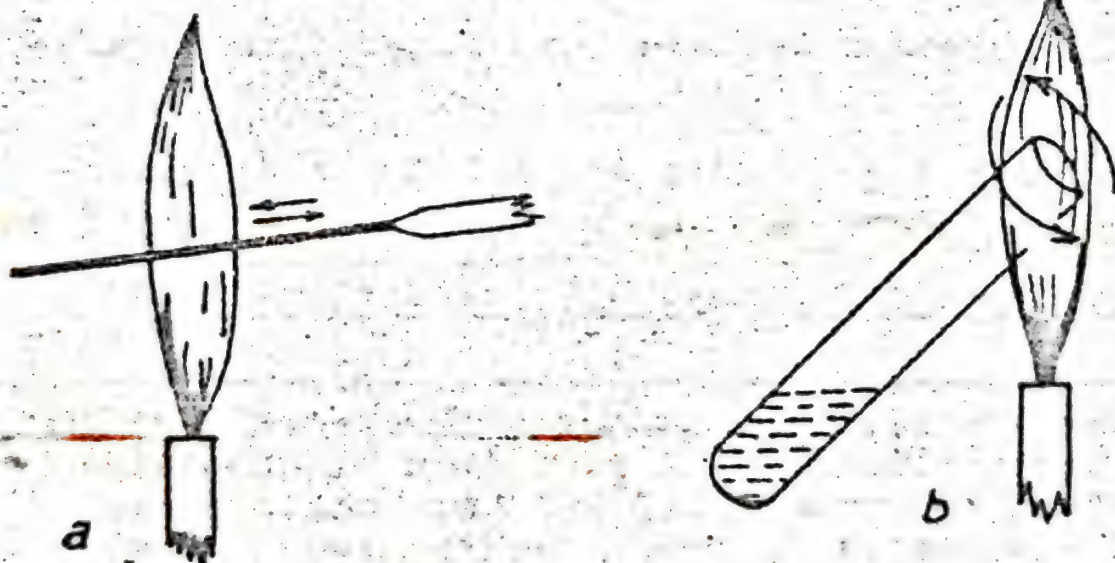


Fig.2 a) Sterilizarea prin flambare a capilarului pipetei Pasteur, b) sterilizarea prin flambare a gurii unei eprubete



Luer), unele pulberi, substanțe uleioase.

Este contraindicată pentru soluții apoase, obiecte din cauciuc sau cu garnituri de cauciuc, țesături, seringile din metal și sticlă (Record), materialul contaminat din laborator etc., deoarece degradează aceste materiale.

Sterilizarea prin aer cald realizată în Poupinel timp de 1 oră la  $180^{\circ}\text{C}$  are eficiență absolută.

Sterilizatorul cu aer cald (Poupinel) este o cutie, cilindrică sau paralelipipedică, cu pereți dubli de tablă. Rezistențe electrice, plasate la partea inferioară a aparatului, și un termostat

permit obținerea și menținerea temperaturii de sterilizare. Un sistem de orificii permite circulația aerului cald în interiorul aparatului (previne stratificarea aerului încălzit) asigu-

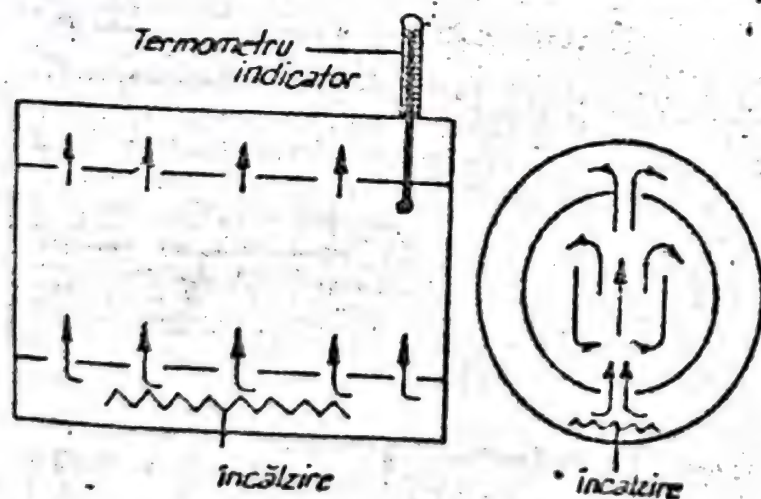


Fig.3 Prezentare schematică a unui sterilizator cilindric cu aer cald. Circulația aerului cald. a) Secțiune longitudinală, b) secțiune transversală



rînd uniformizarea temperaturii. În interior se găsesc rafturi de sită metalică pe care se aşează obiectele de sterilizat (fig.3).

Funcţionare: obiectele pregătite pentru sterilizare se aşează pe rafturile aparatului, fără a-l umple la refuz, cu precauţia de a nu atinge pereţii şi de a lăsa între obiecte mici spaţii care să permită circuitul nestînjenit al aerului cald. Se închide uşa aparatului. Se deschide orificiul de ventilaţie. Se face contactul electric şi se reglează pentru temperatura de  $180^{\circ}\text{C}$ . Din momentul în care se atinge această temperatură se marchează timpul. După o oră se întrerupe curentul. Obiectele sterilizate se scot numai după răcirea aparatului.

### (b) Sterilizarea prin căldură umedă

#### (i) Sterilizarea prin vapori sub presiune

Sterilizarea prin vapori sub presiune se realizează în autoclave la 1 atmosferă ( $121^{\circ}\text{C}$ ) sau 2 atmosfere ( $134^{\circ}\text{C}$ ). Pentru o presiune dată, durata sterilizării la autoclav - timpul de autoclavare - depinde de natura, volumul şi modul de ambalare a materialului de sterilizat (vezi tabelul 1).

Este indicată pentru:

- obiecte din bumbac (lenjerie chirurgicală, tampoane, meşe, vată etc.);



# Tabelul 1

Prezentare comparativă a parametrilor sterilizării prin aer cald și vapori de apă sub presiune. Exemple selectate din practica medicală și de laborator (adaptat după Schmidt/Naumann/Horsch, 1968; Cruikshank, 1965; Perkins, 1957)

Materialul și volumul în care este supus sterilizării	Timpul <sup>1)</sup> de egalizare a temperaturii	Timpul <sup>2)</sup> de omorâre a microbilor	Timpul <sup>3)</sup> de sterilizare <sup>..)</sup>
<u>Sterilizare la Poupinel la 180°C</u>			
Sticlărie, instrumentar metalic în ambalaje cu volum redus	35	25	60
Ibid. în ambalaje voluminoase; seringi luer ambalate în tuburi; pulberi (în cutii Petri în strat mai subțire de 0,5 cm și nu mai mult de 10 g/cutie)	65-95	25	90-120
Ulei de arahide (maximum 85% din volumul recipientului):			
- în fiole până la 20 ml	25	25	50
- în flacoane de 100 ml	45	25	70
- în flacoane de 300 ml	50	25	75
<u>Sterilizare în autoclav vertical la 121°C (1 atmosferă)</u>			
Soluții apoase (maximum 75-80% din volumul recipientului):			
- vol. de 10 ml în eprubete	0	18	18
- vol. de 500 ml	2-7	18	20-25
- vol. de 1000 ml	7-12	18	25-30
- vol. de 2000 ml	17-27	18	35-45
Instrumentar împachetat în hîrtie sau în containere metalice întredeschise	12	18	30
Casolete cu lenjerie chirurgicală (fără a fi îndesată)	27	18	45
<u>Sterilizare la autoclav orizontal cu prevacuum la 134°C (2 atm.)</u>			
Casolete cu lenjerie chirurgicală (chiar îndesată)	1	3	4

<sup>1)</sup> Timpul măsurat în minute

<sup>..)</sup> Măsurat din momentul în care temperatura camerei de sterilizare a atins temperatura selectată. Deci, pentru a obține un material steril în stare de utilizare, la timpii considerați în tabel mai trebuie adăugat timpul de încălzire al aparatului, timpul de răcire și uscare a materialelor (vezi fig.4).



- instrumentarul chirurgical metalic;
- instrumentar, aparate și dispozitive din sticlă cu armături metalice, garnituri și părți din cauciuc (seringi Record, aparate de filtrare ș.a.);
- obiecte și instrumente de cauciuc (mănuși chirurgicale, sonde etc.);
- sticlărie de laborator cu destinații speciale (pentru culturi de celule etc.);
- soluții;
- materialul contaminat din laborator.

Tabelul 1 și fig.4 prezintă, comparativ, parametrii sterilizării prin aer cald și prin vapori sub presiune.

Din tabelul 1 reiese că

- Timpul de omorîre al microbilor și timpul de uniformizare a temperaturii sînt mai lungi în cazul sterilizării prin aer cald decît al sterilizării prin vapori sub presiune. În aer cald, unde căldura se propagă prin conductibilitate și radiație, obiectele se încălzesc mai greu decît în autoclav unde căldura se propagă prin convecție.

- Timpul de sterilizare în Poupinel la  $180^{\circ}\text{C}$  crește peste 1 oră în cazul substanțelor care se încălzesc greu (uleiuri, pulberi), motiv pentru care aceste substanțe se sterilizează în volume mici și în strat subțire.

- Timpul de sterilizare la autoclav la  $121^{\circ}\text{C}$  este de 45-50 min. pentru lenjeria chirurgicală și



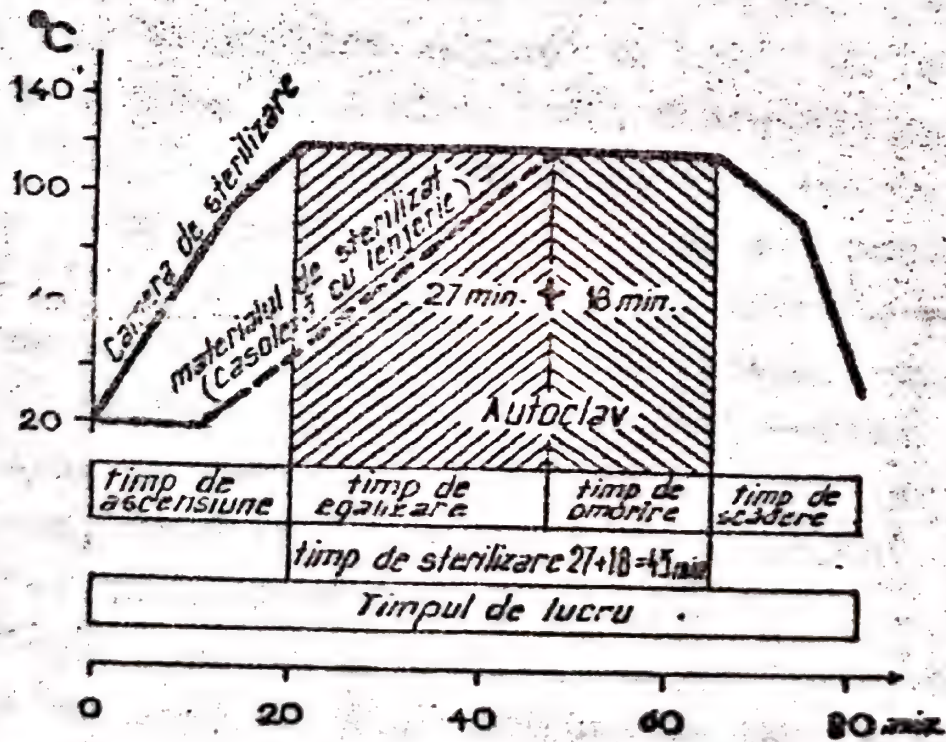
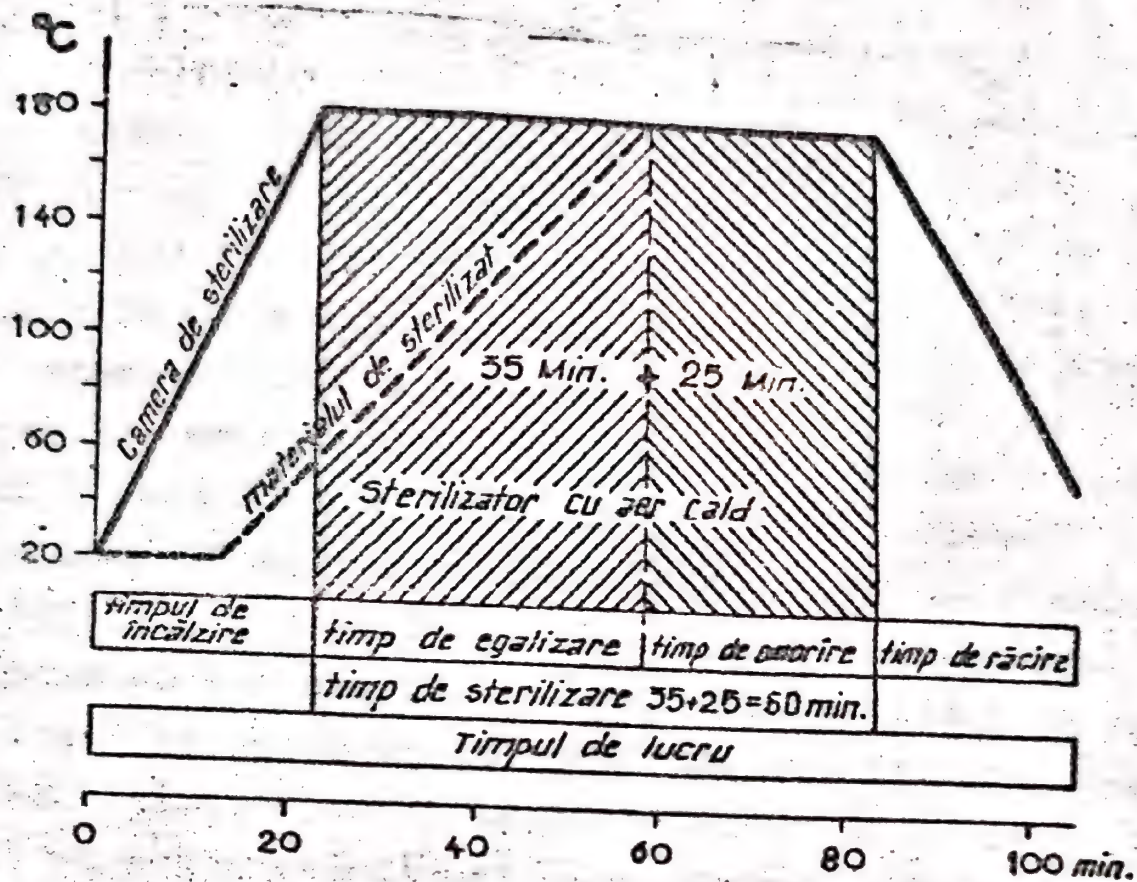


Fig.4 Reprezentare schematică a parametrilor sterilizării prin aer cald și prin vapori sub presiune



de 20-30 min. pentru volumele mici și medii de soluții.

Timpul de omorîre a microbilor variază invers proporțional cu temperatura de sterilizare.  
Timpul de uniformizare a temperaturii variază direct proporțional cu volumul materialelor supuse sterilizării.

Autoclavul are ca piesă principală un cazan cu pereți rezistenți în interiorul căruia, după închiderea etanșă cu un capac masiv prevăzut cu buloane sau un sistem cabestan, vaporii de apă se pot comprima la presiunea necesară sterilizării.

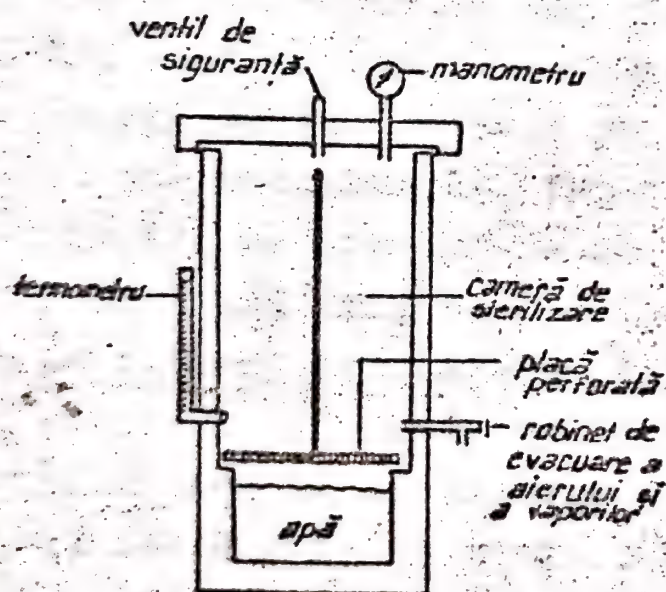


Fig.5 Secțiune schematică simplificată printr-un autoclav cu perete simplu, aparat indicat pentru sterilizări în laboratoare și farmacii (după Schmidt/Nau-mann/Horsch, 1968)

Autoclavele verti-cale, după cum a-rată și numele, au axul lung al caza-nului de presiune dispus vertical.

Autoclavul vertical cu perete simplu (fig.5). La acest tip de autoclav va-porii provin din încălzirea apei a-flată în însuși ca-zanul de presiune. Un manometru permite



controlul presiunii din interiorul cazanului. Un robinet de vaporii pune în legătură interiorul cazanului cu exteriorul. O supapă de siguranță asigură evacuarea vaporilor când presiunea lor depășește o anumită limită de securitate. În interiorul cazanului se află un trepied metalic care servește ca suport materialelor introduse pentru sterilizare într-un coș de sîrmă. Cazanul este cuprins într-un manșon de tablă groasă care la partea inferioară formează un lăcaș pentru adaptarea sursei de căldură.

Functionare: se introduce în autoclav apă pînă la cîtiva cm sub nivelul suportului. Se așează pe suport coșul de sîrmă cu obiectele de sterilizat acoperite cu o hîrtie pentru ca materialele să nu se umezească cu apa provenită de la condensarea vaporilor pe capac. Se închide capacul cu ajutorul buloanelor care se strîng două cîte două, diametral opus, în doi timpi, mai întîi ușor, cu mîna, apoi complet cu cheia. Se deschide robinetul de vaporii și se conectează sursa de căldură. Cînd apa începe să fiarbă, vaporii ies prin robinet, la început în jet discontinuu, întreprins de aerul care este concomitent evacuat din aparat, apoi în jet continuu. Cînd vaporii ies în jet continuu, semn că tot aerul a fost evacuat din autoclav, se închide robinetul de vaporii.

După închiderea robinetului de vaporii presiunea începe să crească. Din momentul în care presiunea a-



tinge valoarea aleasă ( 1 sau 2 atmosfere), se reglează sursa de căldură pentru a menține presiunea la acest nivel pentru timpul indicat. La terminarea sterilizării, se întrerupe sursa de căldură. Autoclavul nu se deschide decât după ce presiunea a coborât la zero și înainte de a se răci. Se deschide robinetul de vaporii, apoi capacul. Se scot materialele.

Dacă se deschide robinetul de vaporii sau capacul înainte de a fi coborât presiunea la zero, temperatura în interiorul autoclavului fiind încă peste  $100^{\circ}\text{C}$ , lichidele vor intra brusc în fierbere, vor umezi dopurile sau chiar vor ieși din recipiente. Dacă se întârzie deschiderea aparatului, vaporii de apă se condensează pe materialele sterilizate și răcite umezindu-le, fapt ce compromite sterilizarea. (Hîrtia de ambalaj umedă, chiar dacă este în mai multe straturi, nu previne pătrunderea bacteriilor de contaminare. Așadar este esențial ca obiectele ambalate în hîrtie să nu vină în contact, după sterilizarea la autoclavul vertical; cu suprafețe contaminate atît timp cît ambalajul lor nu este perfect uscat).

Autoclavul vertical cu perete simplu se utilizează în laboratoare și farmacii fiind indicat pentru sterilizarea mediilor de cultură în microbiologie și, în general, pentru sterilizarea soluțiilor.



Poate fi folosit și pentru sterilizarea celorlalte materiale medicale și chirurgicale, dar prezintă dezavantajul unei uscări dificile a materialului sterilizat, mai ales a lenjeriei chirurgicale.

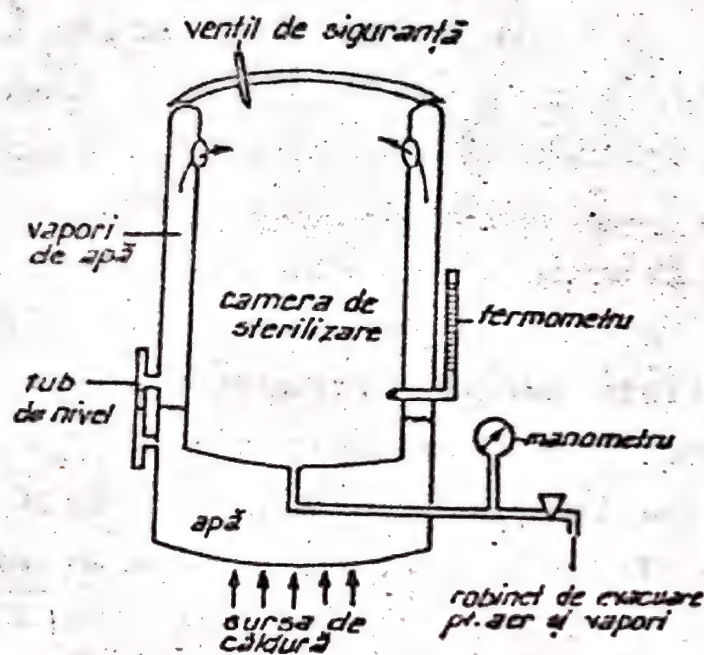


Fig. 6 Secțiune schematică simplificată printr-un autoclav vertical cu perete dublu. Aparat indicat pentru sterilizarea materialului chirurgical (după Schmidt/Naumann/Hersch, 1968)

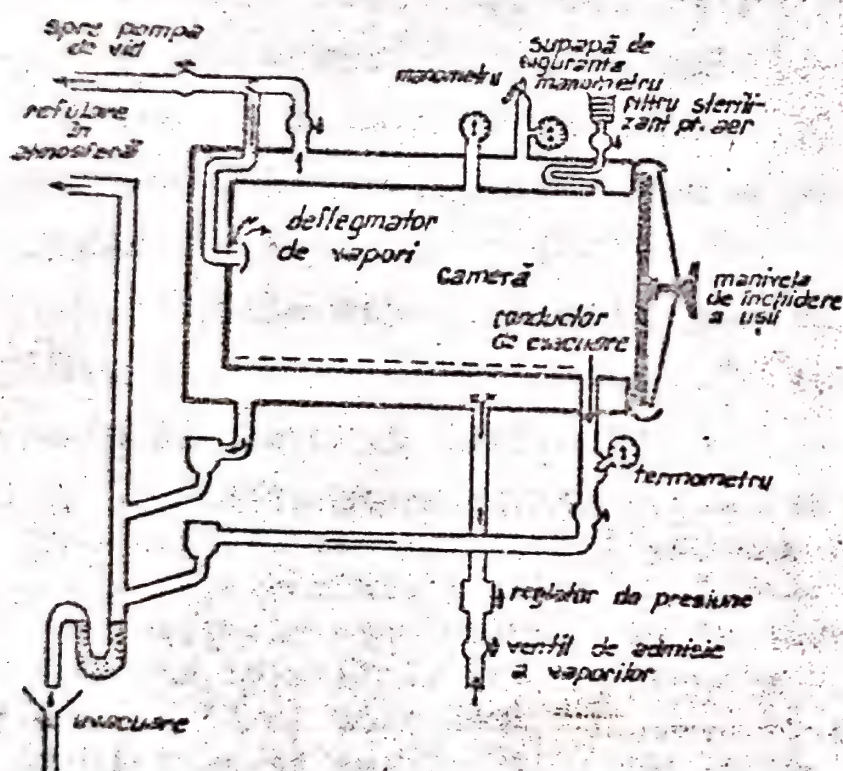
materialului chirurgical: materialele după sterilizare nu mai vin în contact direct cu vaporii de apă și se usucă mai rapid.

La autoclavul orizontal, după cum arată și numele, axul lung al cazanului de presiune este dispus orizontal (fig. 7).

Autoclavul vertical cu perete dublu (fig. 6). La acest tip de autoclav vaporii de apă provin dintr-o sursă plasată sub camera de sterilizare și în afara ei. Sursa de vaporii comunică cu camera de sterilizare pe tot parcursul operației. Acest autoclav este indicat pentru sterilizarea mate-



Vaporii provin dintr-o sursă separată și sînt admiși în cazan unde realizează presiunea dorită. La autoclavele moderne, aerul este îndepărtat printr-o pompă de vid, ceea ce asigură penetrația rapidă și perfectă a vaporilor de apă în porozitățile ambalajelor și materialelor sterilizate. După sterilizare vaporii de apă sînt îndepărtați. Vidal astfel creat asigură uscarea perfectă a materialelor sterilizate.



Autoclavele orizontale cu prevacuum sînt indicate pentru sterilizarea materialelor chirurgicale (lenjerie, instrumentar etc.). Permit uscarea perfectă și rapidă a obiectelor sterilizate. Absența aerului în timpul încălzirii elimină riscul de degradării materialelor sub acțiunea oxigenului în condițiile căldurii

Fig.7 Secțiune schematică printr-un autoclav orizontal cu perete dublu prevăzut cu sisteme de prevacuum, îndepărtare a condensului și uscarea materialelor prin vacuum (după Gruickshank, 1965)

umedă. Sînt destinate cu precădere stațiilor centrale de sterilizare din spitale, blocurilor operatorii. La aceste



aparate nu se sterilizează soluții.

(ii) Sterilizarea fracționată. După expunerea 1/2-1 oră la 100°C - căldură umedă sporii unor bacterii supraviețuiesc.<sup>\*)</sup> Pentru sterilizarea substanțelor termolabile (alimente, medii de cultură, medicamente) se poate recurge la sterilizarea fracționată (tyndallizare) care evită încălzirea la temperaturi peste 100°C. Substanțele de sterilizat se încălzesc timp de 30-60 min. trei zile succesiv la temperatura impusă de compoziția lor (minimum 60-65°C). În intervalele dintre încălziri recipientele cu substanțele supuse sterilizării sînt menținute la temperatura camerei. Formele vegetative germinate din sporii eventual prezenți vor fi distruse la a doua și la a treia încălzire. Se înțelege de aici că sterilizarea fracționată este indicată numai pentru medii de cultură, alimente sau medicamente care permit germinarea sporilor în inter-

\*) Așadar fierberea nu este o metodă de sterilizare în sensul definiției date. Asigurată în interval de 1/2 oră distrugerea tuturor microorganismelor în formă vegetativă și a sporilor unor bacterii, fierberea își găsește însă indicații definite în lupta contra infecției: distrugerea microbilor patogeni din apa de băut și alimente, "sterilizare" instrumentarului de mică chirurgie în situații de urgență, metodă de conservare a alimentelor pentru intervale limitate, "sterilizarea" lenjeriei ș.a. Aceste indicații ca și limitele lor trebuie cunoscute de orice medic. Asupra lor se va reveni și insista în cursul stagiului de epidemiologie.



valul dintre încălziri.

Sterilizarea fracționată se realizează în autoclav la vapori fluenți (robinetul de vapori deschis) sau la baia de apă.

## (2) Sterilizarea prin filtrare

Filtrarea este trecerea unui fluid printr-un corp poros (filtru). Utilizând filtre din materiale și cu porozități convenabile se poate obține debarasarea de microorganisme a fluidului filtrat, acestea fiind reținute mecanic și electrostatic în porii filtrului.

Metoda este indicată pentru sterilizarea aerului și a lichidelor (medii de cultură, medicamente) care nu suportă încălziri.

Filtrele sterilizante utilizate în bacteriologie diferă după natura substanței poroase din care sunt fabricate, după mărimea porilor și formă:

Filtrele Chamberland (confectionate din porțelan) și filtrele Berckefeld (confectionate din pământ de infuzorii) au forma unor luminări (bujii) goale pe ambele capete și închise la un capăt. Filtrele Seitz (confectionate din azbest impregnat cu caolin) au forma unor plăci filtrante. Filtrele Schott (confectionate din sticlă poroasă) au forma unor plăci filtrante montate într-o pîlnie de sticlă. Fiecare filtru poartă un indicator al porozității.

Filtrarea se face prin aspirație sau prin presiune pozitivă. În acest scop filtrele sînt adaptate la diferite dispozitive de filtrare. Schematic, un asemenea dispozitiv se compune dintr-o pîlnie prin intermediul căreia se adaptează filtrul la un recipient de colectare a filtratului steril și o pompă care creează presiunea negati-



vă sau pozitivă necesară (fig.8).

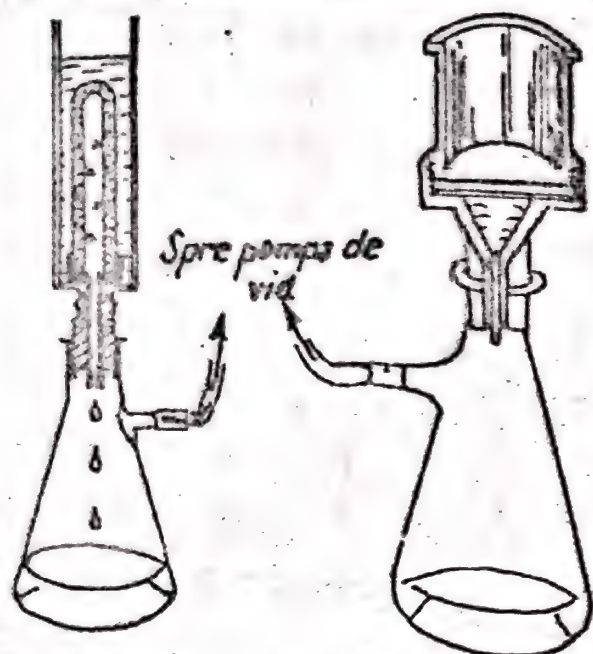


Fig.8 Dispozitive de filtrare prin presiune negativă. A-bujia filtrantă (Chamberlain sau Berckefeld); B-filtru Seitz.

Înainte de folosire, filtrul gata montat la recipientul de colectare a lichidului este sterilizat prin autoclavare.

### (3) Sterilizarea prin radiații

Radiațiile ultraviolete avînd o penetrabilitate redusă indicațiile lor ca agent sterilizant se restrîng la sterilizarea aerului și suprafețelor de lucru în

boxe sterile, săli de operație (de obicei în asociație cu agenți chimici sub formă de aerosoli, vapori).

Razele gama se utilizează pentru sterilizarea industrială a instrumentarului medical disponibil (seringi, flacoane etc.), a unor medicamente ș.a.

(4) Sterilizarea prin ultrasunete are la bază fenomenul de cavitație care se produce la propagarea undelor ultrasonore printr-un mediu apos. Ultrasunetele pot fi utilizate în practica medicală pentru curățarea și sterilizarea instrumentarului stomatologic și de mică chirurgie (ultrasonare în băi de detergenți).



## Controlul eficienței sterilizării

Pentru controlul eficienței sterilizării prin aer cald și vapori sub presiune se folosesc indicatori fizici, chimici și biologici.

(1) Indicatori fizici: termografe etc.

(2) Indicatori chimici

Se folosesc substanțe al căror punct de fuziune este la o temperatură apropiată de cea la care se face sterilizarea. De exemplu, floarea de sulf la  $115^{\circ}\text{C}$ , acidul benzoic la  $121^{\circ}\text{C}$ ; zaharoza care caramelizează la  $170^{\circ}\text{C}$  etc. Fiole conținând aceste substanțe se repartizează la diferite nivele în incinta de sterilizare. Dezavantajul acestor indicatori este că nu dau nici o indicație asupra timpului cât s-a menținut temperatura de fuziune.

(3) Indicatori biologici

Tuburi conținând fire de bumbac impregnate cu spori bacterieni și uscate se plasează la diferite nivele în incinta de sterilizare. După sterilizare se testează viabilitatea sporilor prin însămânțarea lor în medii de cultură adecvate. Sînt indicatori simpli și de mare fidelitate.

## Pregătirea materialului pentru sterilizare

Curățirea și spălarea. Atît materialele de laborator (sticlărie, filtre etc.) cît și instrumentarul și materialele chirurgicale, sonde, seringi



etc. înainte de sterilizare trebuie perfect curățate prin spălare.

Instrumentarul murdărit cu sînge este contaminat, chiar dacă intervenția s-a făcut la o persoană aparent normală, și expune personalul la riscul hepatitei virale.

De aceea, materialele ieșite din lucru contaminate sînt sterilizate sau dezinfectate și înainte de a fi spălate.

- Sticlăria colectată în găleți speciale pentru materialul contaminat se sterilizează la autoclav la  $134^{\circ}\text{C}$ ; pipetele sînt menținute 24 ore în amestec sulfo-cromic.

- Instrumentarul metalic, seringile și acele sînt supuse dezinfecției cu un agent chimic puțin afectat de prezența substanțelor organice: un compus de fenol (lyzol 3%, contact 1-2 ore, ș.a.) sau glutaraldehidă 2% (contact 15-30 min.). Urmează periajul într-o soluție 1-2% de detergenți (Dero, Perlan) în apă caldă; în final urmele de substanțe chimice sînt îndepărtate prin spălare la jet abundent de apă. Pentru curățarea acelor se va utiliza mandrenul.

În lipsa dezinfectanților amintiți se va proceda astfel: instrumentarul și seringile murdărite cu sînge sînt scufundate 15-30 min. într-o baie cu sol. de amoniac 1-2% pentru îndepărtarea sîngelui din anfractuozitățile unde periajul este mai puțin eficient. După aceasta urmează periajul în baia cu soluția caldă de detergent și spălarea în câteva băi cu



apă curată pentru îndepărtarea urmelor de substanțe chimice. Obligator, în final toate aceste băi de spălare vor fi inactivate (fierbere 30 min. sau adăugare de cloramină în concentrație finală de 5% ori hipoclorit de Na pentru a asigura în final  $10 \text{ cm}^3$  Cl/litru).

Pe tot parcursul acestor operații personalul va purta mănuși de cauciuc și halat de protecție și va evita formarea de aerosoli virtual contaminanți.

Prezervarea sterilității materialului în intervalul sterilizare-întrebuințare se face prin diferite procedee care se aleg în funcție de natura materialului și metoda de sterilizare.

Eprubetele și flacoanele, la care ne interesează păstrarea sterilității suprafeței interne și a conținutului, se pun la sterilizat prevăzute cu dopuri de vată și tifon, protejate cu capșon de hîrtie sau foiță de aluminiu.

Tuburile pentru pipete Pasteur se sterilizează



Fig.9 Tub pentru pipete Pasteur pregătit în vederea sterilizării

cu extremitățile infundate cu vată (fig.9).



Pipetele gradate se sterilizează cu filtru de vată la extremitatea care se introduce în gură și învelite individual în benzi de hîrtie sau grupate în tuburi de tablă cu capac (fig.10).

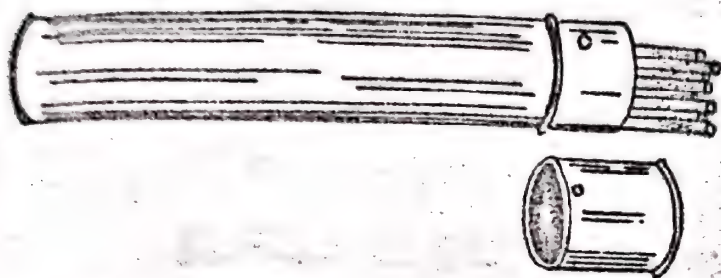


Fig.10 Pipete gradate pregătite pentru sterilizare grupate într-un tub de tablă cu capac

Plăcile Petri se sterilizează învelite individual sau grupate în hîrtie. Mojarele și pistilele lor se învelesc separat în hîrtie (fig.11)

Instrumentele chirurgicale metalice se sterilizează la Poupinel în cutii de tablă

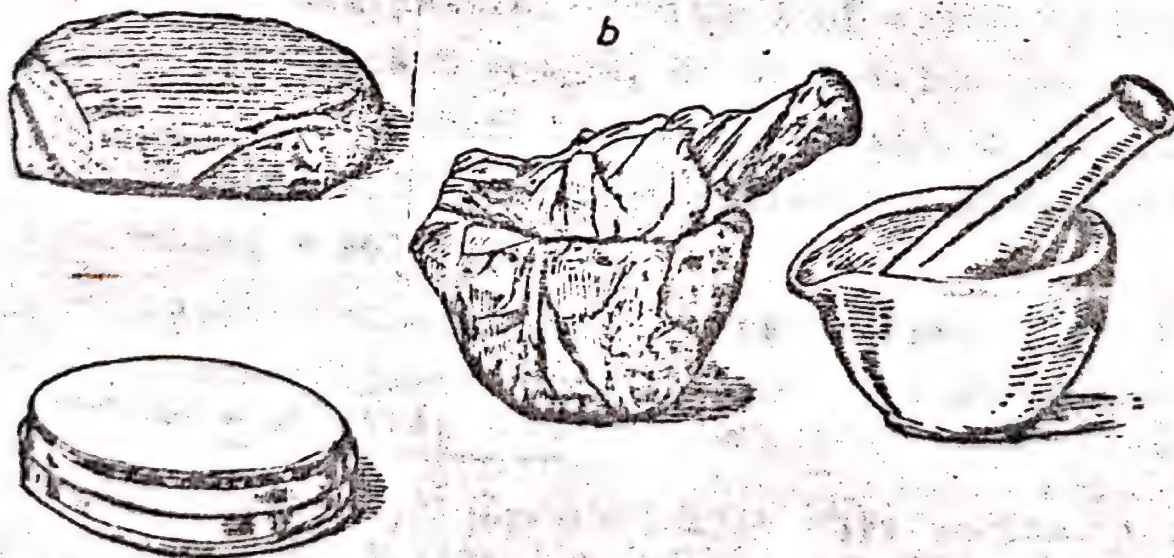


Fig.11 Cutie Petri (a) și mojar (b): împachetate în vederea sterilizării



cu capac.

Sondele de cauciuc și material plastic, instrumentarul destinat endoscopiei se sterilizează în cassolette speciale ale căror orificii se obturează la scoaterea lor din dulapul de sterilizare (formolizare, sterilizare cu oxid de etilen).

Imbrăcămintea chirurgicală, câmpurile operatorii, tampoanele, meșele, instrumentarul chirurgical etc. se sterilizează la autoclav în cassolette (cutii

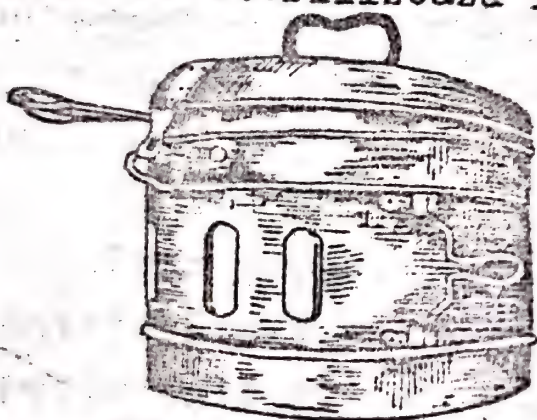


Fig.12 Casoletă

de tablă inoxidabilă prevăzute cu capac și orificii care permit pătrunderea vaporilor de apă în cursul autoclavării și care se obturează la scoaterea din autoclav) (fig.12).

Seringile Record se sterilizează în cassolette la autoclav. Se sterilizează demontate, fiecare seringă alături de pistonul ei în cutie proprie pentru a evita schimbarea pistoanelor între seringi. Acele se sterilizează alături de seringă, în aceeași cutie.

Seringile Luer se sterilizează montate și împachetate în celofan sau hîrtie. Acele se sterilizează separat introduse în tuburi de sticlă de mărime corespunzătoare și învelite individual sau grupate în hîrtie. Pentru destinații speciale (hemocultură, de exemplu) seringile Luer se sterilizează cu acul mon-



tat și introduse într-un tub de sticlă astupat cu dop de vată (fig.13).

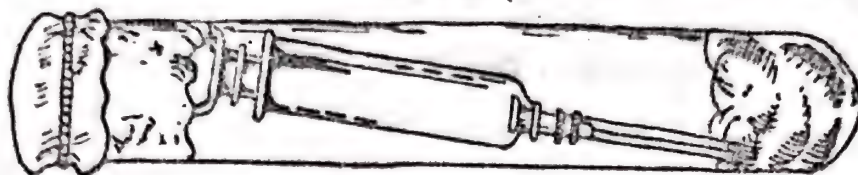


Fig.13 Seringă Luer pregătită pentru sterilizarea la Poupinel

Utilizarea agenților chimici în antisepsie, dezinfecție și în laboratorul de microbiologie.

În laboratorul de microbiologie aceste substanțe își găsesc aplicații limitate la prepararea unor medii de cultură selective, dezinfecția încăperilor (vapori de formaldehidă rezultați prin încălzirea formolului sau paraformaldehidei) și suprafețelor de lucru (cloramină B sol.5%, borat fenil-mercuric sol. 1/2500-1/5000), sterilizarea pipetelor, a lamelor ș.a.(amestec sulfo-cromic), antisepsia mâinilor\* (cloramină B sol.1% ș.a.).

Agentele chimice nu se folosesc pentru

- sterilizarea recipientelor și instrumentelor destinate cultivării microbilor, recoltării și

\*) Pentru antiseptizarea mâinilor este indicat a se turna soluția antiseptică pe mâini; introducerea mâinilor în recipientul cu soluție antiseptică este contraindicată deoarece urmele de substanțe organice care rămân de pe mâini inactivează progresiv antisepticul.



transportului probelor pentru analize microbiologice deoarece urmele de dezinfectant își exercită acțiunea nocivă asupra microorganismelor cercetate;

- sterilizarea instrumentarului chirurgical, stomatologic, acelor și seringilor deoarece au penetrabilitate insuficientă iar virusurile hepatitice (transmisibile parenteral), sporii bacterieni și bacilul tuberculozei sînt deosebit de rezistenți la acțiunea multor dezinfectante în concentrațiile lor uzuale, mai ales în prezența urmelor de substanțe organice.

Prin importanța lor, antisepticele și dezinfectantele depășesc cu mult sfera laboratorului de microbiologie avînd o largă aplicare în chirurgie, în practica epidemiologică, igiena comunală și a locuinței. De aceea, asupra acestei probleme se va reveni în cursul stagiilor și lucrărilor practice la aceste discipline.

Metodica lucrului aseptice în laboratorul de microbiologie (în aceeași măsură aplicabilă în laboratorul de seroimunologie și biochimie clinică).

Obiectivele urmărite sînt:

- evitarea contaminării materialului manipulat cu microbi din mediul exterior (praf din aer, microbi de pe diferite suprafețe etc.) sau provenind



de la manipulator (picături Flugge, microbi de pe tegumentele mâinii, păr ș.a.);

- evitarea contaminării mediului exterior cu microbi din materialul manipulat (manipularea culturilor microbiene, a produselor patologice etc.).

Se lucrează la adăpost de curenți de aer. Când este cazul se lucrează în încăperi speciale în care aerul și suprafețele de lucru sînt sterilizate periodic (săli de operație, boxe sterile) și se poartă îmbrăcăminte specială sterilă (intervenții chirurgicale, manipulări în industria medicamentelor): bonetă, mască, halat, mănuși sau chiar combinezon pentru lucru steril.

Materialele și instrumentele chirurgicale, seringile ș.a. se manipulează la scoaterea din cutii, casolete sau în timpul montării cu ajutorul unei pense sterile (pensa se menține într-o soluție dezinfectantă, de exemplu lizol 3%).

Manipularea în condiții aseptice a produselor microbiene (culturi, produse patologice etc.)  
(fig.14)

În cursul manipulărilor operatorul nu vorbește, poartă bonetă care strînge părul, eventual mască; ușile și ferestrele sînt închise.

(i) Instrumentul cu care se face manipularea, sterilizat în prealabil (pipete gradate, seringi) sau sterilizat în momentul utilizării (ansa, capi-



larul pipetei Pasteur), se ține în mîna dreaptă.

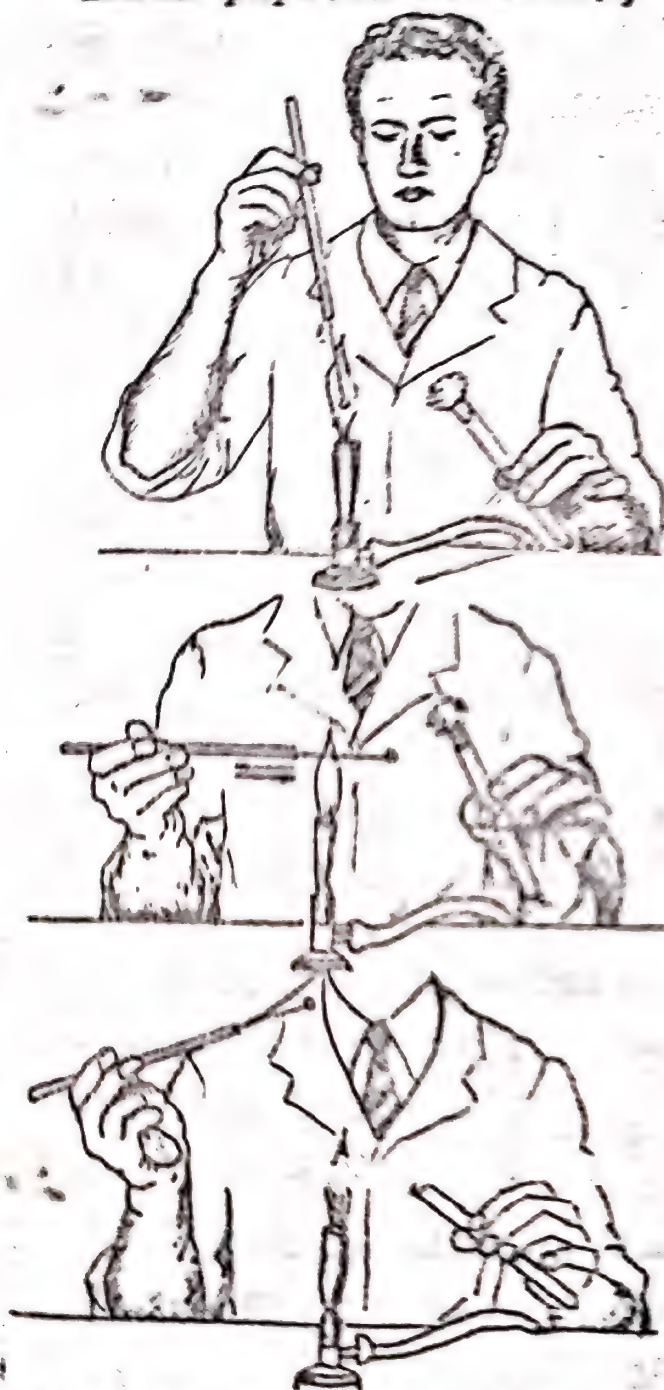


Fig.14 Etape succesive  
ale unei manipulări  
aseptice

instrumentului de manipulare să poată fi controlat permanent cu vederea.

Oricare ar fi, instrumentul se ține în mîna cît mai aproape de extremitatea opusă celei care se introduce în recipient. Ansa se ține ca un creion. Pipetele se țin între police și medius cu indexul aplicat pe orificiul astupat cu vată.

(11) Recipientul din care se prelevă sau în care urmează a fi depus materialul manipulat (cultură microbiană, substanță sterilă etc.) se ține de extremitatea inferioară în mîna stîngă în așa fel încît conținutul și traiectul



(iii) Se scoate dopul recipientului cuprîndu-l între auricular și palma mîinii drepte. Cît timp recipientele sînt fără dop se vor menține înclinate pentru a evita depunerea în interiorul lor a particulelor de praf din atmosferă.

(iv) Se sterilizează prin flambare gîtul și gura recipientului (se rotește pe loc în flacără timp de cîteva secunde).

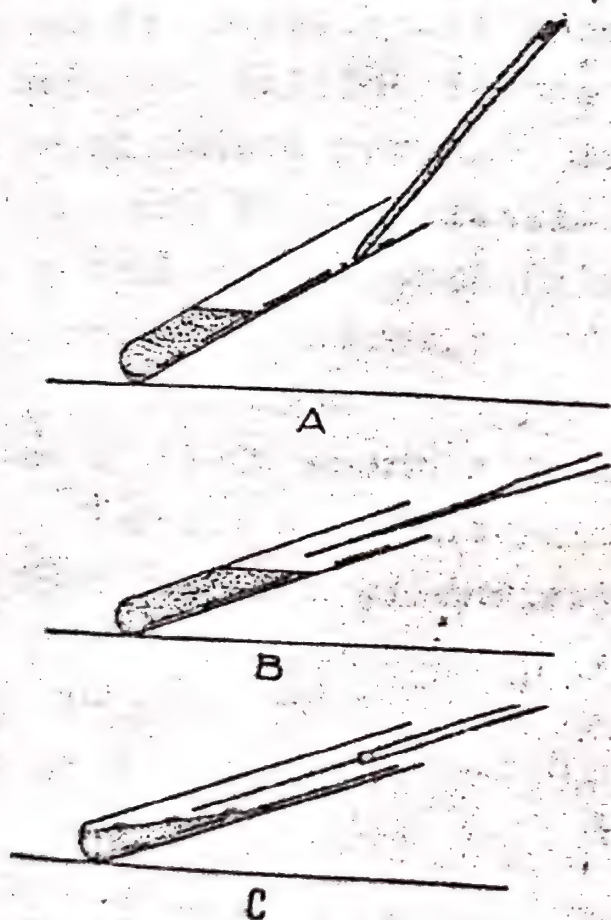


Fig.15 Etape ale unei manipulări aseptice: A-pipetarea unui volum determinat cu pipeta gradată; B-pipetarea cu pipeta Pasteur; C-prelevarea cu ansa.

(v) Se introduce instrumentul și se face prelevarea sau depunerea materialului în recipient după care se retrage cu grijă pentru a evita atingerea pereților și mai ales a gurii și gîtului recipientului (fig.15).

(vi) Se flambează din nou gura și gîtul recipientului. Se introduce dopul.

(vii) Se sterilizează ansa cu precauția de a nu introduce brusc bucla în flacără. Urmele de lichid



de pe ansă pot intra brusc în fierbere stropind și contaminând suprafețele din jur. Se trece ansa de câteva ori succesiv prin flacără după care se încălzesc la roșu bucla și firul pe toată lungimea. Pipetele se depun în cilindrul pentru pipete infecte. După manipulare, pipetele nu se sterilizează niciodată prin flambare.

Toate manipulările aseptice se fac sub controlul vederii.

Principiile lucrului aseptice trebuie extinse și respectate cu strictețe în activitatea spitalicească, indiferent de profilul secției, fiind singurele capabile să prevină și să limiteze intercontaminările în spitale (bolnav-bolnav, personal medical-bolnav).

Metodica lucrului aseptice în spitale, bazată pe aceleași principii, va fi însușită cu ocazia stagiilor clinice.

#### Precauții speciale în cursul activității în laboratorul de microbiologie

(i) În laborator se lucrează cu îmbrăcăminte de protecție (halat, bonetă și la nevoie mască, mănuși și ochelari de protecție). Halatul de protecție nu se supune variațiilor model: nu există „minihalate” protectoare contra microbilor.



(ii) Nu se părăsește laboratorul cu îmbrăcăminte de lucru.

(iii) Se lucrează cu cea mai mare atenție, numai deasupra mesei de lucru și numai după ce regulile lucrului aseptice au fost foarte bine însușite.

(iv) Dacă se produce o contaminare (a suprafeței de lucru, a mâinilor etc.) se iau imediat măsuri de dezinfectie; de pe masa de lucru nu lipsește niciodată vasul cu dezinfectant.

(v) Pe suprafețele de lucru se exclude prezența oricăror obiecte în afara celor cu care se lucrează propriu-zis.

(vi) Este interzis consumul de alimente și fumatul în încăperile de lucru.

(vii) Este interzis a părăsi masa de lucru fără spălarea și antiseptizarea mâinilor.

./A.



## PARTEA A DOUA

### A. METODE DE EVIDENTIERE A BACTERIILOR

Bacteriile pot fi evidențiate prin

- examen microscopic,
- izolare *i n v i t r o* pe medii de cultură,
- izolare *i n v i v o* pe animalelor specific sensibile.

În studiul bacteriilor cele 2 metode, examenul microscopic și izolarea, nu se exclud ci se completează reciproc.



## 2) EVIDENȚIEREA BACTERIILOR PRIN EXAMEN MICROSCOPIC. CARACTERE MORFOLOGICE ȘI COLORABILITATE.

Bacteriile pot fi văzute numai cu ajutorul microscopelor. Ele se urmăresc în produse patologice (puroi, lichid cefalo-rahidian, spută etc.) și în culturi, fie în stare vie (preparate umede necolorate), fie după prealabilă fixare și colorare (preparate colorate).

Pentru necesitățile practicii curente de evidențiere și identificare a bacteriilor, utilizarea microscopului optic este suficientă.

### (1) Preparate microscopice colorate

#### (i) Efectuarea frotiului

Prin frotiu se înțelege materialul microbial (produs patologic, cultură microbială) etalat în strat subțire pe suprafața unei lame de microscop în vederea examenului microscopic.

Pentru efectuarea frotiurilor se folosesc lame de microscop curate și degresate care se marchează, la una din extremități, cu indicativul materialului microbial ce urmează a fi etalat.

Efectuarea unui frotiu cuprinde 3 timpi:

- **E t a l a r e a** : o ansă din produs patologic fluid sau cultură bacteriană în mediu lichid



este întinsă în strat subțire și uniform pe o suprafață de 1-2 cmp în centrul lamei, fără a atinge marginile. Similar, o secțiune dintr-o colonie (de pe geloză înclinată sau din cultura pe o placă Petri), prelevată cu acul, poate fi suspensionată într-o ansă de ser fiziologic depusă în centrul lamei.

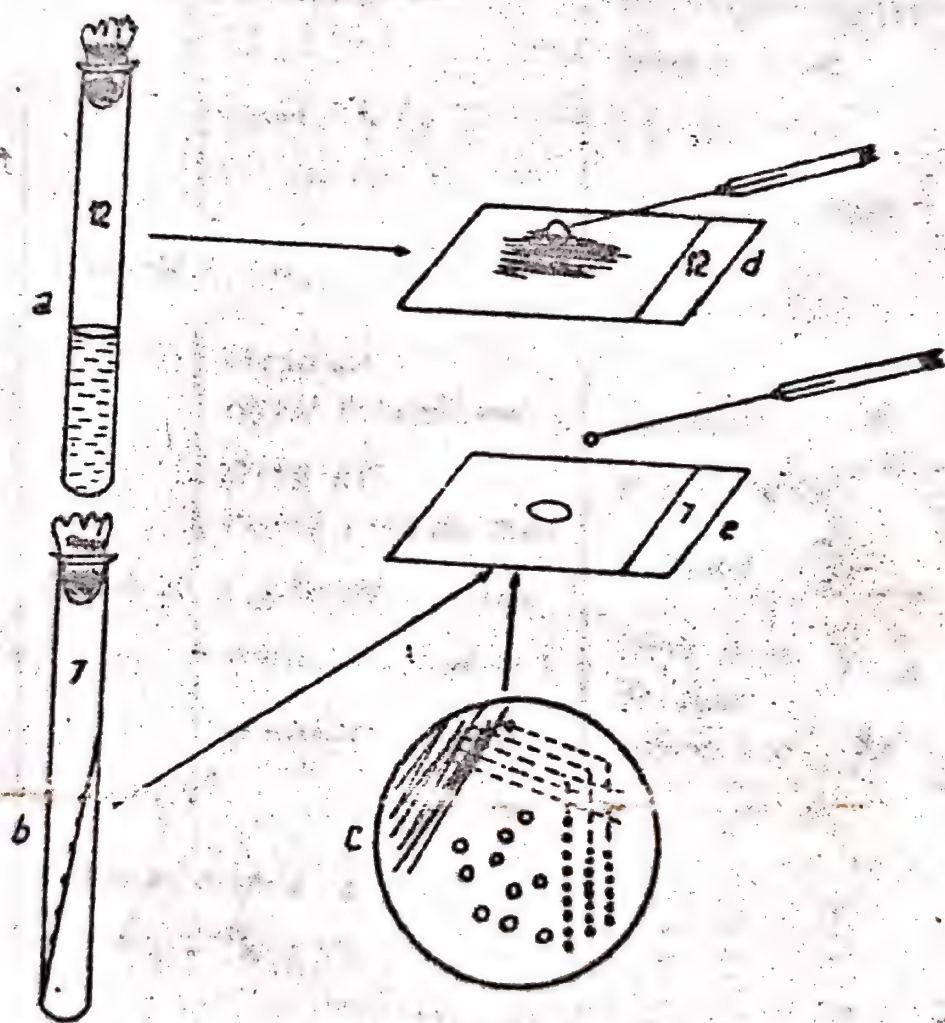


Fig.16 Efectuarea frotiurilor din culturi bacteriene. a) cultură în mediu lichid; b) cultură pe geloză înclinată; c) cultură pe placă cu geloză; d) frotiu din cultura în mediu lichid; e) o ansă de ser fiziologic depusă pe lamă pentru suspensionarea culturii de pe mediu solid.



În cursul etalării ansa și acul se manipulează cu mișcări lente. Aceasta evită formarea aerosolilor (pericol de contaminare) și perturbarea dispoziției caracteristice a bacteriilor în produs. (fig.16).

În cazul fragmentelor de țesuturi (bioptice sau necroptice) se efectuează amprente: pe suprafața de secțiune a țesutului se aplică lama în așa fel încât în porțiunea ei centrală să rămână amprenta țesutului. Alternativ, frotiul poate fi executat prin ștergerea lamei cu suprafața de secțiune a țesutului.

- U s c a r e a : se face la temperatura camerei.

- F i x a r e a prin căldură: lama, cu frotiul uscat în sus, este trecută de câteva ori prin flacăra unui bec de gaz. Temperatura de fixare nu trebuie să fie prea ridicată pentru a nu distorsiona elementele structurale ale bacteriei. Timpul de menținere în flăcără nu trebuie să depășească 5-10 sec., lama nu trebuie să frigă atunci când atingem cu ea dosul mâinii.

#### (ii) Metode de colorare\*)

- Colorațiile simple evidențiază numai morfologia microbilor (dimensiune, formă, gruparea celu-

\*) Pentru prepararea coloranților și reactivilor necesari vezi anexa A.



lelor, prezența sporilor, a capsulei) (fig.17) -  
de exemplu, colorația cu albastru de metilen.  
FORMELE DE BAZA ȘI DISPOZIȚIA CELULELOR BACTERIENE

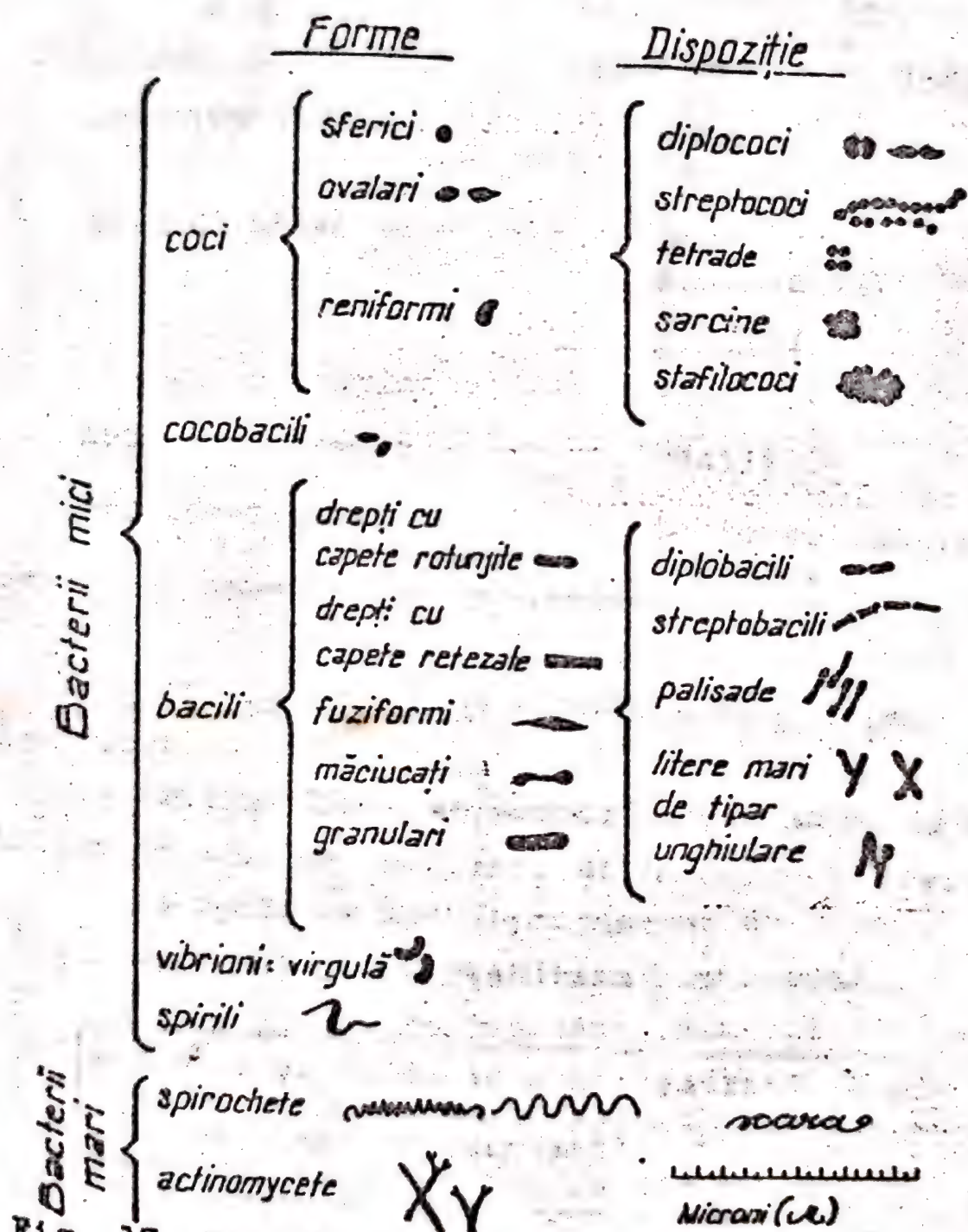


Fig. 17 Formele de bază și dispoziția celulelor bacteriene (schemă)



- Colorațiile speciale se folosesc pentru a evidenția unele detalii morfologice ale celulei bacteriene (granulații metacromatice, flageli etc.) pe care metodele obișnuite de colorare nu le pot evidenția întotdeauna.

- Colorațiile diferențiale evidențiază afară de caractere morfologice și reacțiile de culoare ale microbilor: colorația Gram și colorația Ziehl-Neelsen.

Reacțiile de culoare (sau afinitatea tinctorială) ale bacteriilor sînt condiționate de diferențele de structură și compoziție chimică ale pereților celulari.

Pe baza afinității tinctoriale bacteriile se împart în gram-pozitive și gram-negative sau în acido-rezistente și neacido-rezistente.

Așadar examenul microscopic al preparatelor colorate permite clasificarea bacteriilor într-un grup major sau altul în funcție de

(a) afinitatea tinctorială și

(b) caracterele morfologice pe care le prezintă. Prin aceasta, examenul microscopic este prima etapă de identificare a unei bacterii necunoscute (tabelul 2).



Tabelul 2

Clasificarea bacteriilor după reacțiile de culoare și caracterele morfologice

<u>După</u> <u>reacțiile de culoare</u>	<u>După</u> <u>caracterele morfologice</u>
Gram-pozitive	occi bacili
Gram-negative	occi cocobacili bacili spirili spirochete
Acido-rezistente	bacili
Neacido-rezistente	toate celelalte bacterii

\* Colorația simplă cu albastru de metilen

Loeffler:

- frotiul fixat se acoperă cu soluția de albastru de metilen Loeffler; se menține 30 sec.;
- se spală cu apă de robinet;
- se usucă și se examinează cu imersia.

Microbii și celulele apar colorați în albastru. Unele elemente structurale (capsulă, grănuții metaaromatice) se colorează uneori metaaromatic în roz sau roșu.



## Colorații diferențiale

### Colorația Gram

Soluțiile colorante și reactivii necesari:

- violet de metil sol. apoasă 0,2% ,
- soluție Lugol,
- amestec alcool-acetonă,
- fucsina Ziehl diluată 1/10

Tehnica colorației Gram:

- Colorarea: frotiul se acoperă cu soluția de violet de metil; se menține 30-60 sec. după care se spală cu apă de robinet.
- Mordantarea: frotiul se acoperă cu soluția Lugol; după câteva sec. se varsă și se acoperă din nou cu aceeași soluție; se menține 4-5 minute; se varsă și fără a se spăla se trece la timpul următor
- Diferențierea (decolorarea): se acoperă frotiul cu amestecul alcool-acetonă; decolorarea se continuă pînă cînd în amestecul decolorant nu mai trec urme vizibile de colorant (cca 5-10 sec. pentru frotiurile din culturi microbiene, 10-15 sec., în raport cu grosimea frotiului, în cazul celor din produse patologice); în acest moment se spală cu apă de robinet.
- Recolorarea: frotiul se acoperă cu soluția de fucsina Ziehl 1/10; se menține 30-60 sec. după care se spală cu apă de robinet; se usucă și se examinează la microscop cu imersia.



Bacteriile gram-pozitive apar colorate în violet iar cele gram-negative în roșu. Celulele tisulare apar cu citoplasma colorată în roz iar nucleul în roșu.

#### Verificarea reactivilor pentru colorația Gram.

Pentru fiecare lot de frotiuri, se colorează în aceleași condiții și se examinează un frotiu martor. Frotiul martor se efectuează dintr-o suspensie de Escherichia coli și stafilococ auriu cultivați peste noapte la  $37^{\circ}\text{C}$  și sterilizați imediat prin autoclavare. Pe frotiul martor diferența dintre bacilii gram-negativi și cocci gram-pozitivi trebuie să fie netă.

#### Colorația Ziehl-Neelsen

Mycobacteriile, spre deosebire de toate celelalte bacterii, datorită prezenței în peretele bacterian a unor substanțe ceroase, se colorează la cald cu fucsină bazică și rezistă la decolorarea cu acizi minerali diluați și cu alcool.

Soluțiile colorante și reactivii necesari:

- fucsină fenicată Ziehl,
- acid azotic diluat 1/3,
- alcool etilic  $96^{\circ}$ ,
- albastru de metilen Loeffler

Tehnica colorației Ziehl-Neelsen:

- Colorarea: frotiul fixat și așezat pe stativul de colorare se acoperă cu soluția de fucsină Ziehl și se încălzește cu ajutorul unei lămpi de spirit până la emiteră de vapor (fără a se ajunge



la fierbere); se menține 10 min. la această temperatură reîncălzind din cînd în cînd. Frotiul trebuie să fie în permanență acoperit cu colorant. De aceea, la nevoie se poate adăuga o nouă cantitate de colorant. Se spală lama abundant cu apă de robinet.

- Decolorarea: se acoperă frotiul cu soluția de acid azotic 1/3. Amestecul decolorant ia culoarea galbenă iar culoarea roșie a frotiului dispare. Durata decolorării variază în raport cu grosimea frotiului. După cca un minut se spală cu apă de robinet. Dacă frotiul devine alburui, decolorarea este terminată. Dacă redevine roșu, se continuă decolorarea.

Se decolorează cu alcool timp de cîteva secunde. Se spală cu apă de robinet.

- Recolorarea: frotiul se acoperă cu sol. albastru de metilen Loeffler pentru 1 minut. Se spală cu apă de robinet. Se usucă și se examinează la microscop cu imersia.

Bacilii acido-rezistenți apar colorați în roșu. Bacteriile neacido-rezistente apar colorate în albastru ca și celulele tisulare a căror citoplasmă se colorează în albastru deschis iar nucleul în albastru închis.

Verificarea reactivilor pentru colorația Ziehl-Neelsen se face prin colorarea și examinarea unui frotiu dintr-o suspensie de micobacterii omorîte.



x  
(iii) Examenul microscopic cu imersia

Principiile de funcționare și părțile componente ale microscopului sînt deja cunoscute de studenți în sem.IV. De aceea, ne rezumăm la prezentarea tehnicii de examinare și întreținere a microscopului cu imersie.

- Se depune o picătură de ulei de cedru pe frontul colorat.
- Se pune lama pe platina microscopului și se fixează cu ajutorul cavalierilor astfel încît picătura de ulei de cedru să fie în dreptul axului optic al microscopului.
- Se aduce în axul optic al microscopului obiectivul cu imersie prin rotirea revolverului.
- Se ridică condensatorul la maximum iar diafragmul de cîmp se deschide la maximum.
- Privind lateral, se coboară tubul microscopului, manipulînd cu viza macrometrică, pentru a face contactul între lentila frontală a obiectivului și picătura de ulei de cedru de pe lamă. Se impune atenție pentru a nu sparge lama sau lentila obiectivului.
- Privind prin ocular se centrează lumina cu ajutorul oglinzii concave.
- Se prinde imaginea manipulînd cu atenție viza macrometrică.
- Se pune la punct imaginea manipulînd viza micrometrică. Viza micrometrică nu se manipulează mai



mult de 1-2 rotații înainte sau înapoi.

La terminarea examenului:

- Se ridică tubul microscopului cu 1-2 cm.
- Se dă jos preparatul de pe platina microscopului.
- Se șterge bine cu pulpa degetului lentila obiectivului. Se șterge degetul cu un tifon.
- Se pune microscopul la adăpost de praf (sub husă sau în cutie).

## (2) Preparate microscopice necolorate (umede)

Examenul microscopic al preparatelor necolorate ale bacteriilor vii suspensionate în ser fiziologic este folosit pentru observarea mobilității acestora, rareori și a formei și dimensiunilor aproximative.

Citoplasma bacteriilor este incoloră și are un indice de refracție puțin diferit de al mediului de suspensie - în general apos (mediu de cultură, produs patologic, ser fiziologic). Din această cauză, bacteriile necolorate devin vizibile la microscop numai în condiții speciale de iluminare: (i) reducerea diafragmului de câmp, (ii) examen pe fond negru, (iii) microscopie în contrast de fază. Aceste metode nu sînt utilizate ca metode de rutină.

În preparatele umede mobilitatea bacteriilor trebuie deosebită de mișcarea browniană (vibrații



neregulate, rapide, de mică amplitudine cauzate de bombardamentul molecular) și de mișcările produse de curenții de lichid (în care bacteriile sînt antrenate toate în aceeași direcție). Criteriul de apreciere a mobilității reale a bacteriilor este modificarea poziției relative a două bacterii una față de alta.

Bacteriile cu refringență redusă - spirochetele, leptospirele - nu pot fi examinate în stare vie decît la microscopul cu fond negru.

(i) Examinarea unui preparat umed la microscopul obisnuit

- pe o lamă de microscop curată se depune cu pipeta Pasteur o picătură din suspensia bacteriană de cercetat (cultură sau produs patologic);
- picătura se acoperă cu o lamelă curată ale cărei margini au fost unse în prealabil cu ulei de parafină pentru a evita evaporarea lichidului în cursul examenului (permite în același timp examinarea mobilității bacteriilor anaerobe);
- se coboară condensatorul și se închide parțial diafragma de cîmp;
- se așează preparatul pe platina orizontală și se examinează cu un obiectiv uscat puternic (x40) după 2-3 min. necesare pentru stabilizarea preparatului;
- după examinare, preparatul se depune într-un



borcan cu soluție dezinfectantă (amestec sulfo-cro-  
mid).

(ii) Efectuarea examenului microscopic pe  
fond negru

**Material necesar:**

- condensator cardioid sau paraboloid;
- sursă puternică de lumină prevăzută cu un condensator pentru a furniza un fascicol de ra-  
ze paralele;
- obiectiv cu apertură numerică sub 1. Dacă se  
utilizează obiective cu inversie este necesar  
sa acestea să fie prevăzute cu un diafragm i-  
ris sau alt dispozitiv de reducere a aperturii  
pentru a împiedeca pătrunderea razelor directe.

**Examinarea:**

- se depune pe suprafața lentilei condensato-  
rului o picătură de ulei de cedru și se coboară u-  
șor condensatorul;

- se pune preparatul între lamă și lamelă  
(pregătit ca mai sus) pe platina orizontală a mi-  
croskopului, după ce în prealabil s-a depus o pi-  
cătură de ulei de cedru pe fața inferioară a lamei.  
Lamele utilizate pentru microscopia pe fond negru  
trebuie să aibă o grosime de 1,0 - 1,1 mm pentru a  
situa preparatul în focarul condensatorului (dis-  
tanța focală de 1,2 mm).

- Se ridică ușor condensatorul pentru a face  
contactul celor 2 picături de ulei de cedru;

- se concentrează lumina privind printr-un obiec-  
tiv slab (x10). Fascicolul luminos de la sursă este



orientat spre condensator cu fața plană a oglinzii. Dacă centrarea oglinzii este bună în centrul singurului trebuie să se observe un inel luminos strălucitor (imaginea sursei de lumină).

- Fără a schimba obiectivul, se concentrează condensatorul ridicându-l sau coborîndu-l ușor până când imaginea sursei de lumină se reduce la un punct strălucitor cât mai mic posibil. În acest moment preparatul se află în focarul condensatorului. Când preparatul se află deasupra sau dedesubtul focarului condensatorului imaginea sursei luminoase este înclără.

- Se schimbă obiectivul cu care s-a făcut centrarea luminii și a condensatorului cu obiectivul ales pentru examinarea preparatului. Se prinde și se pune la punct imaginea.

- După examinare, preparatul se depune în borcanul cu soluție dezinfectantă.



### 3. CULTIVAREA BACTERIILOR. IZOLAREA IN CULTURI PURE

Bacterii aparținând unor specii diferite pot avea caractere morfologice și reacții de culoare asemănătoare. De aceea, identificarea bacteriilor impune studierea unui complex de caractere suplimentare. Acestea sînt cercetate pe culturi obținute prin creșterea bacteriilor *i n v i t r o* pe *m e d i i* de *c u l t u r ă*.

Dacă în proba studiată coexistă mai multe specii microbiene, în scopul identificării lor, este necesară izolarea prealabilă a fiecărei bacterii în cultură pură.

Uneori, în produse patologice microbii sînt în număr redus și nu pot fi văzuți la examenul direct microscopic, dar pot fi evidențiați (izolați) prin cultivare pe medii adecvate.

Se impun cunoscute 2 operații distincte:

- (A) prepararea unor medii de cultură adecvate,
- (B) izolarea în cultură pură a microbilor.



(A) MEDIILE DE CULTURA

(1) Calitățile de bază ale unui mediu de cultură

Mediile de cultură trebuie să permită multiplicarea bacteriilor ca și manifestarea tuturor proprietăților lor biologice care le caracterizează ca unități taxonomice (specii, genuri etc.). Pentru aceasta trebuie să posede următoarele calități:

- (a) să fie nutritiv,
- (b) să îndeplinească condițiile fizico-chimice de osmolaritate, pH, potențial de oxido-reducere optime pentru dezvoltarea bacteriilor,

(c) să permită urmărirea facilă a apariției culturilor microbiene și a tuturor modificărilor legate de aceasta.

Mediile lichide trebuie să fie perfect clare; numai în acest mod poate fi surprinsă opacifierea determinată de cultivarea bacteriilor. Mediile solide trebuie să aibă suprafața perfect plană și lucioasă pentru a permite observarea apariției coloniilor bacteriene care uneori au dimensiuni foarte reduse.

- (d) să fie sterile.



(2) Clasificarea mediilor de cultură

(a) Dură consistentă

(i) Medii lichide (bulion nutritiv, apă peptenată ș.a.).

În mediu lichid bacteriile aparținând diferitor specii cultivă amestecate unele cu altele. Pentru aceste motive

mediile lichide sînt folosite îndeosebi pentru studiul caracterelor biochimice ale bacteriilor izolate în cultură pură, izolarea bacteriilor din unele produse patologice monobacteriene etc.

Pentru utilizare, mediile de cultură lichide se repartizează în eprubete, baloane etc. (fig.13).

(ii) Medii solide

Cel mai frecvent sînt obținute prin gelificarea mediilor lichide cu agar (fitocoloid polisaharidic extras din diferite specii de alg marine) (geloză nutritivă, geloză-sînge etc.). Medii solide mai pot fi obținute prin coagularea termică a unor lichide biologice cu înalt conținut proteic (ser sanguin, ou).

Pe suprafața mediilor solide sau în profunzimea lor bacteriile cultivă sub formă de colonii.



Colonia este o acumulare locală de bacterii descendente dintr-un singur individ.

Această populație bacteriană descendentă în linie verticală dintr-un singur individ și care alcătuiește o colonie bacteriană, are caractere genetice comune și poartă numele de clonă sau tulpină bacteriană.

De multe ori aspectul coloniilor este deosebit de la un microb la altul.

Mediile solide sînt folosite pentru izolarea bacteriilor în culturi pure și pentru studierea caracterelor de cultură ale acestora. Mai sînt folosite și pentru studiul unor caractere biochimice.

Pentru utilizare, mediile solide se repartizează în plăci Petri, în eprubete, unde sînt solidificate în coloană sau în pantă (fig.18).

(iii) Medii semisolide (geloza moale). Sînt obținute prin gelificarea bulionului nutritiv printr-o cantitate mai redusă de agar (5% în mediile semisolide față de 20% în cele solide). Sînt folosite pentru studiul mobilității bacteriilor și a unor caractere biochimice. Pentru utilizare, mediile semisolide se repartizează în coloană în tuburi.



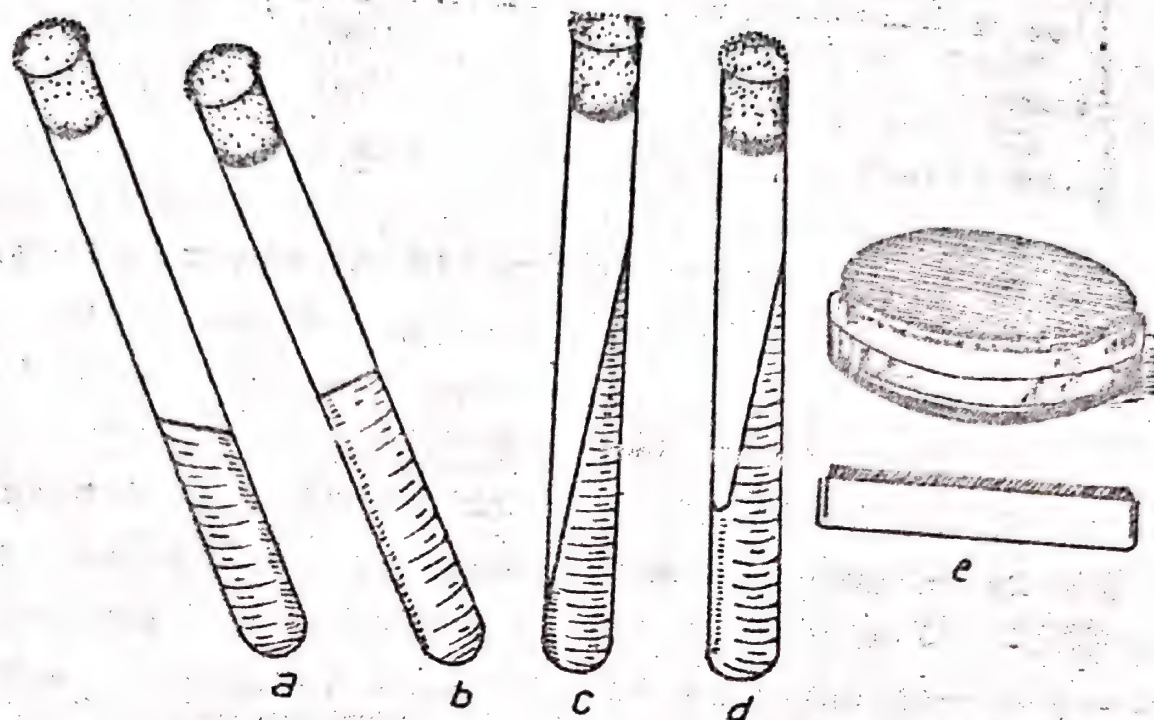


Fig.18 Diferite modalități de repartizare a mediilor de cultură: (a) mediu lichid în tub; (b) geloză nutritivă repartizată în coloană; (c) idem în pantă; (d) idem în coloană și pantă; (e) idem în placă Petri

(b) După compozitie

(i) Medii simple sau medii de bază (bulionul nutritiv, geloză nutritivă etc.).

Mediile simple permit cultivarea unui număr apreciabil de bacterii. Conțin numai ingredientele de bază: extractul de carne, peptonă, clorură de sodiu.

(ii) Medii compuse (îmbogățite) (bulion glucozat, bulion ser, geloză sânge etc.). Sînt destinate cultivării unor bacterii pretențioase nutritiv. Se



obțin prin adăugarea de sânge, lichid de ascită, ser, extract de levură (aport de factori de creștere) sau zaharuri (glucoză) la mediile de bază.

(iii) Medii speciale

- Medii de izolare. Izolarea microbilor se poate face pe orice mediu solid corespunzător din punct de vedere nutritiv. Pentru a facilita însă izolarea microbilor patogeni din produse patologice cu floră de contaminare (materii fecale, exsudat faringian etc.) se utilizează o serie de medii speciale:

• Mediile de diferențiere sînt medii care conțin substratul pentru o enzimă bacteriană caracteristică și un indicator care evidențiază atacarea acestui substrat. Aceste medii evidențiază un caracter metabolic care diferențiază între ei microbi cu caractere de cultură și morfologice identice. De exemplu, mediul Drigalski (geloză nutritivă lactozată și turnesolată) permite diferențierea enterobacteriilor lactozo-pozitive de cele lactozo-negative. Geloza sînge permite diferențierea bacteriilor după absența sau prezența și tipul hemolizei produse.

• Mediile selective sînt medii solide care conțin substanțe cu acțiune inhibitorie pentru dezvoltarea altor bacterii decît acelea a căror izolare se urmărește. Pentru a facilita reperarea coloniilor unei anumite bacterii, mediile selective conțin ingrediente care le imprimă și caracterul de



mediu diferențial.

Exemple de medii selective: medii cu telurit de potasiu pentru izolarea bacilului difteric din exsudatul faringian; mediul SS (geloză nutritivă cu săruri biliare, verde brillant, citrați și hiposulfid de sodiu și aditionată cu lactoză și roșu neutru ca indicator) pentru izolarea shigellelor și salmonel-  
lelor din materii fecale.

• Mediile de îmbogățire (a nu se confunda cu mediile îmbogățite) sînt medii lichide care favorizează înmulțirea anumitor bacterii patogene și inhibă selectiv dezvoltarea florei de asociație dintr-un produs patologic. Însămînțarea și incubarea în aceste medii este utilă ca etapă premergătoare însămînțării pe medii selective atunci cînd se urmărește izolarea unei bacterii patogene care se află în număr redus în produse cu floră de asociație abundentă.

Exemple de medii de îmbogățire: mediul Kauffmann-Muller (bulion nutritiv tetratrat) sau mediul cu selenit acid de sodiu inhibă flora comensală în favoarea salmonellelor în probe de materii fecale.

• Medii de identificare. La un mediu nutritiv de bază se încorporează un ingredient care constituie substratul activității unei enzime bacteriene și un indicator adecvat care evidențiază modificarea substratului în cursul activității bacteriei cercetate. Bacterii cu asemenea medii sînt folosite pentru identificarea bacteriilor.



mediu diferențial.

Exemple de medii selective: medii cu telurit de potasiu pentru izolarea bacilului difteric din exsudatul faringian; mediul SS (geloză nutritivă cu săruri biliare, verde brillant, citrați și hiposulfid de sodiu și aditionată cu lactoză și roșu neutru ca indicator) pentru izolarea shigellelor și salmonel-  
lelor din materii fecale.

• Mediile de îmbogățire (a nu se confunda cu mediile îmbogățite) sînt medii lichide care favorizează înmulțirea anumitor bacterii patogene și inhibă selectiv dezvoltarea florei de asociație dintr-un produs patologic. Însămînțarea și incubarea în aceste medii este utilă ca etapă premergătoare însămînțării pe medii selective atunci cînd se urmărește izolarea unei bacterii patogene care se află în număr redus în produse cu floră de asociație abundentă.

Exemple de medii de îmbogățire: mediul Kauffmann-Muller (bulion nutritiv tetracionat) sau mediul cu selenit acid de sodiu inhibă flora comună în favoarea salmonellelor în probe de materii fecale.

• Medii de identificare. La un mediu nutritiv de bază se incorporează un ingredient care constituie substratul activității unei enzime bacteriene și un indicator adecvat care evidențiază modificarea substratului în cursul activității bacteriei cercetate. Bacterii cu asemenea medii sînt folosite pentru identificarea bacteriilor.



(B) CULTIVAREA SI OBTINEREA BACTERIILOR IN CULTURA PURA

(1) Însămînțarea și izolarea bacteriilor în cultură pură

Însămînțarea constă în depunerea într-un mediu de cultură a materialului bacterian (produs patologic sau cultură), inoculum, în vederea cultivării bacteriilor.

Repicarea este însămînțarea într-un mediu de cultură proaspăt a unei bacterii dintr-o altă cultură.

Izolarea este operația prin care o bacterie este obținută în cultură pură.

În funcție de natura inoculum-ului și a mediului de cultură, pentru însămînțare și izolare se folosesc instrumente variate.

Acul de însămînțare este confecționat din sîră inoxidabilă (platină sau crom-nichel) a cărei grosime depinde de consistența materialului microbian manipulat. Una din extremitățile firului este fixată într-o baghetă de sticlă sau de metal. Cealaltă extremitate poate fi dreaptă, în care caz se numește ac simplu și se utilizează pentru repicările coloniilor de dimensiuni mici, pentru însămînțările prin înțepare etc. Cînd firul se termină printr-o buclă (cu diametru variabil de la 1 la cîțiva mm) este numit ansă sau ceză și se utilizează pentru însămîn-





Fig.19 Acul de însămînțare:  
a) ac simplu, b) ansă,  
c) spatulă

țarea pe medii lichide sau solide. Din fire groase, turtite la capăt se obține spatulă utilizată pentru manipularea coloniilor bacteriene cu o consistență deosebită (fig.19).

Pipeta Pasteur este o pipetă capilară obținută prin efilarea unui tub de sticlă.

(1) Însămînțarea cu epuizarea inoculum-ului pe suprafața mediului în plăci Petri este metoda de elecție pentru izolarea bacteri-

ilor din produse plurimicrobiene. Placa - cu suprafața mediului bine uscată prin menținerea cea 30 min. la termostat la  $37^{\circ}\text{C}$  cu capacul întredeschis (fig.20 A) - se ține pe masa de lucru. Cu mîna stîngă se întredeschide capacul. Ansa se ține în mîna dreaptă, ca un creion, oblic față de suprafața mediului (fig.20B). Se apasă foarte ușor pentru a evita zgîrierea acestuia.

O mică porțiune din produsul bacterian este



dispersată cu ajutorul ansei sau cu tamponul (dacă recoltarea probei de la pacient s-a făcut în acest fel) pe un sector limitat al plăcii (fig.21 A). Se sterilizează ansa; se verifică temperatura prin atingerea mediului.

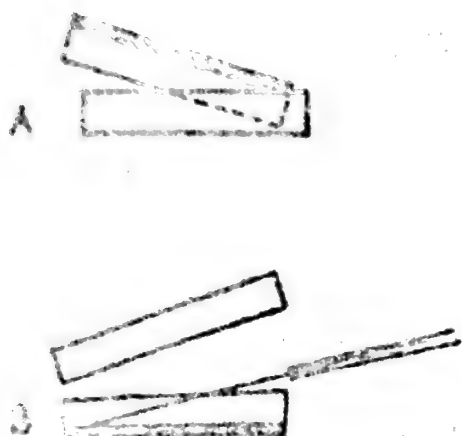


Fig.21: a-uscarea suprafeței mediului la termostat; b- poziția ansei față de suprafața mediului în timpul însămînțării pe o placă Petri

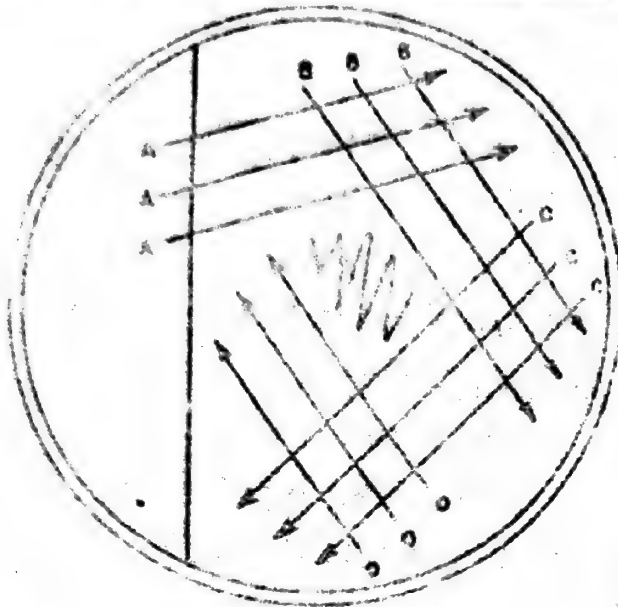
Trecînd cu ansa peste suprafața însămînțată, se descriu 3-4 striuri paralele la distanțe de 5-10 mm una de altă pe un alt sector al plăcii (fig.21 B). Se repetă operația peste sectoarele C, D și E ale plăcii. În acest mod, în ultimile arii însămînțate se vor obține colonii bine individualizate.

c) Insămînțarea pe suprafața de difuzie - Într-o cutie (geloză inclinată, cu protecție anti-încălzi de așezare, se introduce și se înclină în tub cu mediu pînă deasupra lichidului de condensare. Se retrage ansa descriind pe suprafața mediului, cu grijă pentru a nu-l zgîria, striuri în zigzag pentru dispersia inoculumului. În acest mod se însămînțează ansa pe mai multe tuburi. Pe suprafața mediului din ultimile tuburi se vor obține colonii



izolate.

(iii) Insaamintarea prin intepare in mediu semisolid repartizat in coloana se utilizeaza pentru



cercetarea mobilitatii, a unor caractere biochimice, sau pentru conservarea bacteriilor in laborator. Se efectueaza cu acul simplu. (fig.22).

(iv) Metode speciale de izolarea se folosesc in

Fig.21. Schema de dispersie a inoculumului pe suprafata mediului repartizat in plasa Petri

urmatoarele cazuri:

- izolarea pe

medii lichide se

face exclusiv din produse aerobice si anaerobice in care bacteriile se afla in numar mic, prea mic pentru a putea fi evidentiata microscopie sau izolate pe medii solide. Pentru izo-



Fig.22 Insaamintarea prin intepare in colcana de geloză moale



lare se procedează la însămînțarea unei cantități mari din produs (cîteva picături pînă la cîteva ml)

- Izolarea bacteriilor sporulate de cele nesporulate pe baza termorezistenței sporilor. Produsul în care sînt prezente bacterii sporulate este suspensionat în ser fiziologic și încălzit la baie de apă la  $80^{\circ}\text{C}$  timp de 10 min. după care se face însămînțarea pentru izolare în condițiile enunțate mai sus.

- Izolarea prin însămînțări pe suprafața mediilor selective.

- Izolarea prin metode biologice se bazează pe sensibilitatea particulară, selectivă a unor animale de laborator față de unele specii bacteriene (sensibilitatea particulară a șoarecelui pentru pneumococ sau a cobaiului pentru bacilul tuberculozei etc.).

## (2) Incubarea

Incubarea constă în menținerea mediilor de cultură, inoculate, în condiții necesare dezvoltării culturii: condiții de temperatură, raportul față de oxigen ș.a. Pentru majoritatea speciilor bacteriene culturile apar după cca 18-24 ore de incubare la temperatura optimă de dezvoltare. Pentru unele specii perioada de incubare necesară apariției culturii este mai lungă: de la cîteva zile pînă la cîte-



va săptămîni.

(a) Condițiile de temperatură

Bacteriile patogene sînt organisme mezofile, majoritatea avînd temperatura optimă de dezvoltare cuprinsă între 30 și 37°C. Această temperatură constantă este asigurată prin menținerea mediilor însemîntate în termostați - dulap sau încăpere termozolată prevăzută cu sursă de încălzire (electrică) și un sistem termoreglator..

(b) Raportul cu oxigenul

(i) Bacteriile strict aerobe sînt cultivate în prezența aerului.

(ii) Bacteriile strict anaerobe sînt cultivate la adăpost de oxigenul liber.

(iii) Bacteriile facultativ anaerobe pot fi cultivate atît în prezența cît și în absența  $O_2$ .

(iv) Bacteriile microaerofile cultivă numai în prezența urmelor de oxigen liber.

(v) Unele bacterii necesită pentru dezvoltare o atmosferă cu 5-10%  $CO_2$  și sînt cunoscute sub numele de bacterii carboxifile.

Majoritatea bacteriilor patogene sînt aerobe și facultativ anaerobe; cultivarea lor nu impune condiții speciale din acest punct de vedere: cultivă pe medii aerobe.

Cultivarea în anaerobioză . Indepărtarea oxigenului liber și prezervarea culturii de contactul cu oxigenul atmosferic se obțin prin:



- "regenerarea" mediilor.) repartizate în recipiente care asigură un contact redus cu aerul..) și prezervarea lor, după inoculare, de contactul cu aerul printr-un strat de ulei de parafină;

- adăugarea la medii a unor ingrediente cu activitate reducătoare (acid thioglicolic, carne prăjită ș.a.);

- incubarea culturii în recipiente speciale (anaerostate) din care aerul poate fi îndepărtat și înlocuit cu hidrogen.

- În lipsa anaerostatului, într-o cutie Petri poate fi creată o incintă etanșă din care  $O_2$  este îndepărtat prin reacția cu pirogallolul în mediu alcalin...) (fig.23).

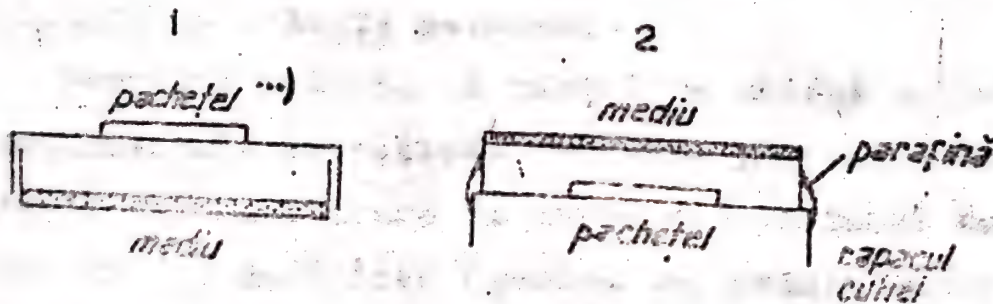


Fig.23 O modalitate simplă de formare a unei incinte anaerobe într-o cutie Petri

..) "Regenerare" = fierberea tuburilor cu mediu timp de 15 min. în baia de apă și răcirea lor bruscă la curent de apă înaintea inoculării.

..) Tuburi Weinberg, tuburi cu mediu repartizat în coloană înaltă ș.a.

...)

Un pachetel din hîrtie de filtru conținînd pirogallol 0,4g/  $CO_3K_2$  0,4g/ talc 8g este prins cu bandă adezivă de capacul cutiei cf. schemei din fig.23.



Cultivarea în atmosferă cu bioxid de carbon.

Culturile sînt introduse în termostat într-un borcan închis. Dacă într-un asemenea borcan este lăsată să ardă o luminare, cînd concentrația bioxidului de carbon atinge 5-10%, lumînarea se stinge.



B. IDENTIFICAREA BACTERIILOR. TEHNICI GENERALE

Vorbind despre lucrurile și ființele care ne înconjoară le dăm un nume, nu le descriem prin ansamblul caracterelor lor. Pentru aceasta omul a fost obligat să compare lucrurile și ființele, să le reunească în aceeași grupă pe cele mai asemănătoare pentru a le putea desemna sub același nume (definirea și marcarea unităților); a fost obligat să clasifice (aranjarea unităților într-un sistem).

Numai un sistem de unități rațional marcate permite a identifica, prin comparație, altele. și a comunica rezultatele unei terțe persoane.

Profilul practic al cărții ne obligă a limita aici considerentele teoretice. Amănunte privind specificul unității de clasificare în lumea vie (taxonul sau unitatea taxonomică), definirea speciei bacteriene etc.etc. sînt date în cursul teoretic și pot fi aprofundate consultînd bibliografia aferentă capitolului.

Pentru a identifica o bacterie, se cercetează o sumă de caractere:

- caractere morfotinctoriale (vezi capitolul 2)
- caracterele de cultură (vezi capitolul 4),
- caracterele biochimice (vezi capitolul 4).



Prin comparație cu caracterele unităților taxonomice stabilite, bacteria studiată este încadrată progresiv într-o familie, gen, specie.

Cercetarea altor caractere:

- structura antigenică (vezi capitolul 6),
- spectrul de sensibilitate la bacteriofagi (lizotiparea), permite încadrarea bacteriei studiate într-o diviziune infraspecifică sau alta: serotip, lizotip ș.a.

De multe ori, în laboratorul de microbiologie clinică, sîntem interesați în urmărirea unor caractere specifice de tulpină:

- spectrul de sensibilitate la antibiotice (vezi capitolul 8),
- patogenitate (vezi capitolul 5).

Clinicianul este interesat, în primul rînd, să știe cu ce antibiotic poate ataca bacteria care s-a demonstrat a fi cauza unei infecții (în eventualitatea în care aceasta impune un tratament antimicrobian) și de-abia în al doilea rînd cum se numește această bacterie. De aceea, în laboratorul de bacteriologie clinică ordinea cercetării caracterelor unei bacterii în scopul identificării poate fi inversată și să înceapă cu cercetarea caracterelor de tulpină (antibiograma).

Epidemiologul este interesat să știe dacă între



tulpinile bacteriene izolate dintr-un focar epidemic de boală infecțioasă există sau nu în întinătate. De aceea laboratoarele de bacteriologie sanitară trebuie să-l informeze nu numai cum se numesc aceste bacterii ci și asupra serotipului, biotipului, lizotipului ș.a. acestora.



#### 4 CERCETAREA CARACTERELOR FIZIOLOGICE ALE BACTERIILOR

##### (A) CERCETAREA CARACTERELOR DE CULTURA

###### (1) Condițiile optime de obținere a culturii

Se rețin în acest cadru

- necesitățile nutritive (cultivare pe medii uzuale, simple sau numai pe medii îmbogățite în anumiți factori de creștere);
- cultivarea lentă sau rapidă;
- raporturile cu oxigenul (cultivare în aerobioză, anaerobioză etc.)

###### (2) Aspectul culturii

Aspectul culturii pe medii lichide prezintă prea puține caractere distinctive pentru a putea fi utilizate cu folos în identificarea bacteriilor.

Aspectul coloniilor pe suprafața mediilor solide variază mai mult de la o specie bacteriană la alta fără a permite însă diferențieri categorice.

Se urmăresc (fig.24):

- dimensiunea: colonii mari (2-3 mm diametru), colonii mici (0,1-1 mm diametru), colonii mijlocii (1-2 mm diametru);
- conturul: circular cu margini întregi, lobat,



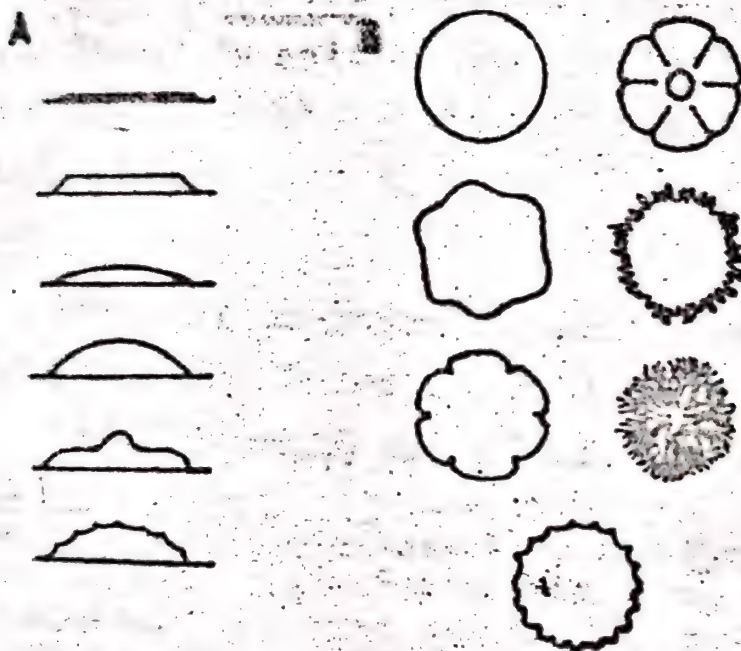
fimbriat;

- relieful: plat, bombat, acuminat, papilat;  
- suprafața: lucioasă, umedă sau uscată, ru-  
goasă;

- culoarea: nepigmentată sau pigmentată;  
- opacitatea: opace sau transparente;  
- consistența: untoasă, mucoasă, friabilă,  
membranoasă;

- aderența la mediu: neaderente sau puternic  
aderente de suprafața mediului;

- emulsionabilitatea în ser fiziologic sau  
soluție de tripaflavină 1/500: emulsionabile sau  
neemulsionabile.



Pe baza acestor caractere pot fi diferențiate variantele de cultură S și R.

#### Forma S

(smooth-neted) colonii cu contur circular, regulat sau lobat, cu suprafața ne-

Fig.24. Relieful (A) și conturul (B) coloniilor bacteriene

tedă, lucioasă și umedă, ușor emulsionabile în ser fiziologic sau și în soluția 1/500 de tripaflavină.

Forma R (rough-rugos): colonii cu contur neregulat, crenelat sau fimbriat, cu suprafața rugoasă și uscată, care nu pot fi emulsionate în ser fiziologic sau soluția 1/500 de tripaflavină.



Majoritatea bacteriilor, olt timp posedă patogenitatea și stuctura antigenică caracteristice, cultivă sub forma S. Trecerea acestor bacterii la forma R este legată de pierderea patogenității și de o degradare a structurii antigenice.

Numai un număr redus de bacterii se prezintă în mod normal în formă R: de exemplu, bacilul Koch.

Pe același mediu, colonii identice ca aspect pot aparține unor specii bacteriene diferite.

Pe același mediu, colonii cu aspect diferit pot aparține aceleiași specii.

Aceeiași specie dezvoltă colonii cu aspect diferit în funcție de condițiile de cultivare.

## (B) CERCETAREA ACTIVITATII BIOCHIMICE

Fiecare unitate taxonomică bacteriană (gen, specie etc.) are un spectru propriu de activitate enzimatică. Studiarea acestuia are o importanță deosebită pentru identificarea bacteriilor. Activitatea enzimelor bacteriene este urmărită prin modificările pe care le produc asupra substratului corespunzător înglobat, de obicei, în mediu de cultură.

Se urmăresc:

- activități enzimaticice în cadrul metabolismu-



lui energetic și catabolismului glucidic;

- activități enzimactice în cadrul catabolismului protidic;

- determinarea unor necesități nutritive și substanțe donatoare de energie.

Redăm un minim de date tehnice necesare parcurgerii lucrărilor practice privind identificarea bacteriilor. Studenții nu au obligația de a reține datele tehnice: pentru lucrările respective și le vor consemna în caietul de referate și vor lucra cu caietul alături.

(1) Activități enzimactice în cadrul metabolismului energetic și catabolismului glucidic

(i) Punerea în evidență a căilor principale ale metabolismului energetic. Diferențierea între metabolizarea pe cale oxidativă (respiratorie) sau fermentativă a glucozei: bacteria este însemnată prin înțepare în 2 tuburi cu mediu adecvat conținând glucoză în proporție de 1% și un indicator de pH. Incubarea se face în condiții de aerobioză și anaerobioză. Dacă degradarea glucozei se face oxidativ, indicatorul virează numai în tubul incubat în aerobioză. Dacă se face fermentativ, virajul apare în ambele tuburi (fig. 25).

(ii) Evidențierea sistemelor enzimactice respiratorii  
Oxidaza. Pe o rondelă de hârtie de filtru cu diametrul de cca 7 cm, introdusă într-o cutie Petri, se depun 2-3 picături din soluția apoasă de tetrametil p-fenilendiamină sol. 1% (soluția este utilizabilă în intervalul de 2 ore de la preparare). Pe locul unde a fost depus reactivul se dispersează imediat o ansă de cultură (ansă de pla-



tină). Apariția unei culori roșii purpurii în interval de 10 sec. indică o reacție pozitivă.

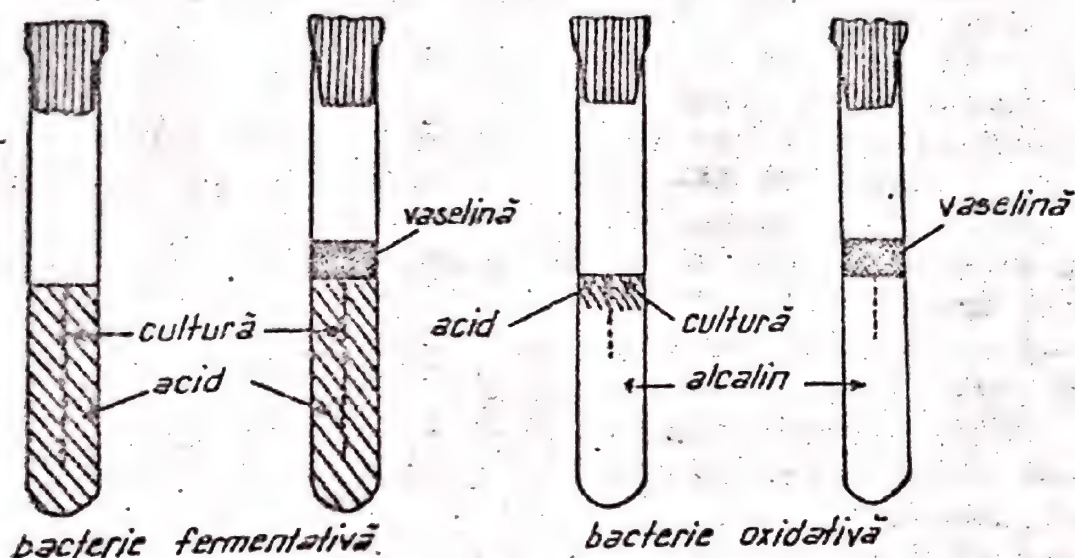


Fig. 25 Proba de oxidare-fermentare

**Bacteriile oxidative:** produc o acidifiere redusă ( $\text{CO}_2$ , care rezultă din oxidările cu care este cuplată respirația) limitată la zona aerobă a tubului neparafinat. În tubul parafinat nici o modificare sau chiar lipsa culturii. Bacteriile oxidative sînt strict aerobe sau microaerofile.

**Bacteriile fermentative:** produc o acidificare intensă (acumulare de acid lactic, acid formic etc.) Acidificarea mediului se produce în ambele tuburi.

**Bacteriile fără acțiune asupra carbohidratului** lasă mediul nemodificat sau îl alcalinizează.

**Catalaza.** Într-un tub de aglutinare se face o suspensie densă a culturii de examinat în volum de 1-2 ml ser fiziologic. Se adaugă cîteva picături de apă oxigenată (sol. 3% de peroxid de hidrogen). Nu se agită. Apariția în



interval de 5 minute a unor bule de gaz indică o reacție pozitivă. Nu se utilizează culturi provenite de pe medii cu sînge.

(iii) Determinarea căii fermentative prezintă interese pentru identificarea bacteriilor din familia *Enterobacteriaceae*. La aceste organisme există 2 căi fermentative principale; calea acidă mixtă și calea butilen-glicolică.

Bacteriile care folosesc calea acidă mixtă acidifică puternic mediul (pH sub 4,5) prin acumulare de cataboliți finali acizi (glucoză → acid piruvic → alcool etilic, acid acetic, acid formic, acid lactic, acid succinic). Acidifierea este pusă în evidență prin reacția la roșu metil.

Bacteriile care folosesc calea butilen-glicolică produc o acidifiere redusă și tranzitorie a mediului, cantitatea totală de acizi formați fiind mult mai mică decît în primul caz (glucoză → acid piruvic → acetilmetilcarbinol → butilen-glicol). Acetilmetilcarbinolul este pus în evidență prin reacția Voges-Proskauer.

Bacteria cercetată este însemîntată în apă peptonată și glucozată (mediul Clark-Lubs). După 24-48 ore de incubare la 37°C, se adaugă 2 picături din soluția indicator de roșu metil. O reacție pozitivă (bacteria cercetată fermentează glucoza pe calea acidă mixtă) se traduce prin apariția unei culori roșii. Dacă reacția este negativă, culoarea care apare este galbenă.

Dacă reacția la roșu metil este negativă, se execută în continuare, pe același tub de cultură reacția Voges-Proskauer. La un ml cultură se adaugă 0,6 ml din soluția alcoolică 5% de alfa-naftol și 0,2 ml soluție apoasă 40% de KOH. Se agită. O reacție pozitivă se traduce prin apariția unei culori roșii intense între 15 min. și o oră de la adăugarea reactivilor.

(iv) Spectrul de utilizare al hidraților de carbon  
Se cercetează prin cultivarea bacteriei în apă peptonată în care s-a introdus hidratul de carbon respectiv și un indicator de pH pentru evidențierea metaboliților acizi.



Introducerea în mediu a unui tub Durham (tub mic închis la o extremitate și introdus în mediu cu gura în jos) permite evidențierea metaboliților gazoși (fig.26). Tuburile sînt incubate timp de 7 zile la 37°C și urmărite zilnic pentru producerea de acid și gaz. Fermentarea unor hidrați de carbon se poate cerceta și pe medii solide după incorporarea lor în mediu împreună cu un indicator de pH. Dacă zahărul este fermentat produce acidifierea mediului în jurul coloanei bacteriei respective. Colonia și porțiunea de mediu din jur capătă culoarea caracteristică indicatorului în mediu acid. Dacă bacteria este înșămîntată prin înțepare în profunzimea unui astfel de mediu, producerea de gaz se evidențiază prin fragmentarea coloanei de mediu de către bule de gaz.

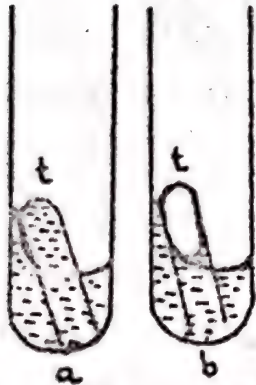


Fig.26 Tubul Durham (t) pentru evidențierea producerii de gaz prin fermentarea zaharurilor: a-lipsa gazului; b-prezența gazului

(2) Activități enzimatică în cadrul catabolismului protidic.

(i) Activitatea proteolitică se cercetează prin înșămîntarea bacteriei în mediu gelatinat (mediu înșămîntat prin înțepare este incubat la 22°C și se urmărește pînă la 30 zile pentru apariția culturii și a lizei), pe ser coagulat (urmărire pînă la 14 zile de incubare la 37°C).

(ii) Producerea de  $H_2S$  . Bacteria de cercetat se înșămîntează prin înțepare în geloză nutritivă cu acetat de plumb sau în tubul în care cultivă bacteria cercetată se fixează pe dop o bandă de hîrtie de filtru impregnată cu acetat de plumb. Se urmărește apariția sulfurii de plumb de culoare neagră: înnegrirea traiectului de înșămîntare



a bacteriei sau înnegrirea hîrtiei de filtru indicator.

(iii) Producerea de urează se urmăreşte prin însămînţarea bacteriei cercetate într-un mediu care conţine uree şi un indicator de pH. Virarea indicatorului în domeniu alcalin ca urmare a cultivării bacteriei atestă formarea de amoniac prin hidroliza ureei.

(iv) Producerea de indol prin dezaminarea triptofanului. Bacteria de cercetat este cultivată timp de 24-48 ore în apă peptonată. Apariţia indolului se evidenţiază cu ajutorul reactivului Ehrlich (p-dimetilaminobenzaldehidă 4 g, alcool etilic 96° 380 ml, acid clorhidric concentrat 80 ml). La tubul de cultură se adaugă 1 ml reactiv Ehrlich. Apariţia unui inel roşu-rubiniu la suprafaţa mediului indică prezenţa indolului.

(v) Producerea de aminoacid-decarboxilaze se evidenţiază prin apariţia unei reacţii alcaline în urma cultivării bacteriei cercetate în medii conţinând aminoacizii respectivi (arginină, lizină, ornitină).

(vi) Producerea aminoacid-dezaminazelor. Cultivarea bacteriei cercetate pe medii conţinând aminoacizii respectivi (fenilalanină etc.) determină apariţia acizilor alfa-cetonici corespunzători. Aceştia dau cu clorura ferică o culoare verde.

(vii) Producerea arginin-hidrolazei. Bacteria cercetată se cultivă în mediu conţinând arginină. Ca urmare a hidrolizei argininei apare amoniac. O reacţie pozitivă se traduce deci prin apariţia de amoniac care dă cu reactivul Nessler o culoare brună.

### (3) Determinarea unor necesităţi nutritive

Se face pe medii sintetice la care se adaugă substanţele respective: diferiţi factori de creştere, substanţe oferite ca sursă de carbon, azot etc.



## 5 ANIMALELE DE LABORATOR ÎN INVESTIGAȚIA BACTERIOLOGICA

35

Inocularea experimentală la animale de laborator este utilizată pentru izolarea unor bacterii patogene din produse patologice sau/și pentru identificarea acestora.

Speciile animale curent folosite<sup>o</sup>) în aceste scopuri în laboratorul de bacteriologie sînt rozătoarele mici: șoarecele și cobaiul, mai rar iepurele.

Pentru obținerea unor rezultate concludente în experimentarea pe animale în laboratorul de microbiologie este necesară

(i) alegerea speciei animale sensibilă selectiv pentru microbul suspectat;

(ii) proba legăturii între simptomele și leziunile observate și microbul inoculat. Trebuie eliminate:

- accidentul individual (se inoculează cel puțin 2 animale),

- accidente de cauză străină experimentului (carențe nutritive, infecții intercurente etc.) - se

.)

In capitolul de față nu prezentăm tehnicile de inoculare pe oul embrionat, una din gazdele folosite pentru izolarea și studiul rickettsiilor. Aceste tehnici vor fi prezentate la lucrările practice de virologie.



inoculează numai animale noi, sănătoase (carantinate minimum 3 săptămâni), bine întreținute. Fiecare lot experimental va fi însoțit de animale martor (animale inoculate cu ser fiziologic pe aceleași căi și în aceleași cantități ca și animalele din experiment).

Starea de sănătate a animalelor se apreciază după aspectul general (animale vioaie, cu părul neted și lucios, bine nutrite, cu ochii limpezi, fără cruste sau scurgeri nazale sau otice, fără tulburări digestive) și temperatură. Experimentatorul trebuie să cunoască manifestările morbide ale bolilor spontane ale animalelor cu care lucrează.

### (1) Conținția animalelor de laborator

Cunoașterea modalităților de conținție și imobilizare a animalelor de laborator este indispensabilă pentru inocularea lor corectă și în condiții de securitate.

Cobaiul: cu o mână se apucă de centura scapulară cu-

prinzând toracele și membrele anterioare. Cealaltă mână cuprinde centura pelvină (fig. 27).

Soarele: trebuie manipulat cu atenție deoarece mușcă. Se prinde de vârful cozii între index și policele mâinii drepte. Se pune animalul pe masă sau capacul borcanului și se apucă de pielea cefei cu indexul și policele mâinii stângi

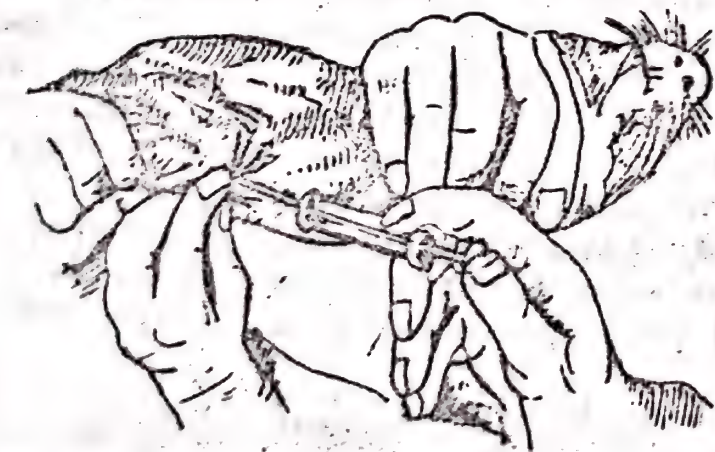


Fig. 27 Conținția manuală a cobaiului în vederea inoculării

(fig. 28 a). În final se imobilizează în mîna stîngă după cum se vede în figura 28 b.





Fig. 28 Conținția manuală a șoarecelui în vederea inoculării

În lipsa unui ajutor imobilizarea se poate face cu ajutorul unor dispozitive speciale (fig. 29 și 30)

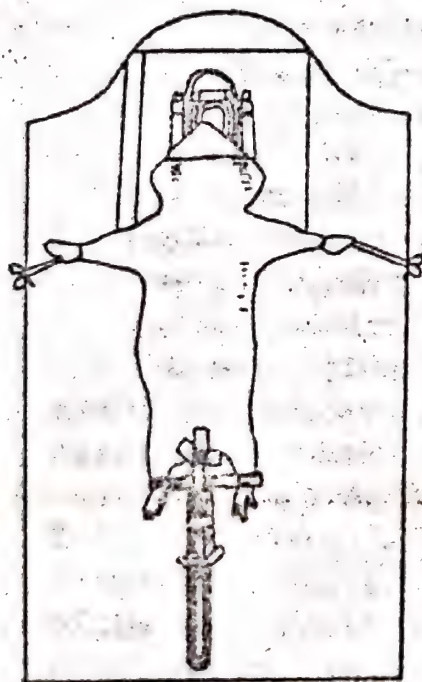


Fig. 29 Imobilizarea cobaiului în aparat Latapie

lui.

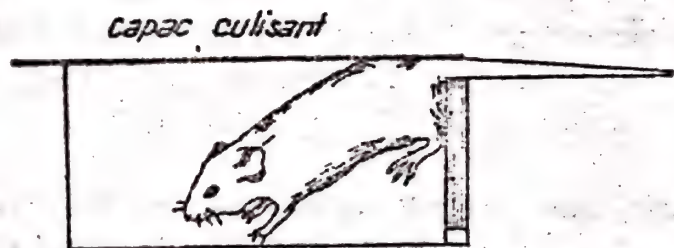


Fig. 30 Dispozitiv pentru imobilizarea șoarecelui în vederea inoculării intravenoase

## (2) Marcarea

Animalele alese pentru inoculare sînt marcate prin vopsire și prin etichetarea cuștilor și borcanelor în care sînt introduse loturile de animale inoculate. Este o condiție esențială pentru urmărirea rezultatelor experimentu-



### (3) Inocularea

Inocularea se face cu seringi și ace sterile după prealabila antiseptizare a tegumentului cu tinctură de iod.

Materialul microbial de inoculat poate fi reprezentat de:

- culturi microbiene în mediu lichid sau suspensii în ser fiziologic ale culturilor pe medii solide;
- filtrate de culturi microbiene;
- produse patologice, ca atare sau suspensionate în ser fiziologic.

Inocularea intra-dermică este calea de elecție pentru testarea toxinelor cu efect dermonecrotic sau pentru cercetarea stărilor de sensibilizare (iepure, cobai). Se face pe flancurile epilate. Pielea este fixată între police și index și cu un ac fin se inoculează încet 0,1-0,2 ml produs. La locul de inoculare se produce o mică bulă iar pielea se decolorează luând aspectul de coajă de portocală.

Inocularea subcutanată. Pe această cale se inoculează culturi microbiene sau toxine. Este calea de elecție pentru inocularea produselor patologice cu floră de asociație. Flora de asociație rămâne cantonată la locul de inoculare iar microbul patogen pătrunde în circulație. Pentru șoareci se practică sub pielea spatelui, iar pentru cobai pe flancuri sau fața internă a coapsei. Cu 2 degete se face un pli cutanat. Acul se introduce la baza pliului pînă în țesutul celular subcutanat. Se inoculează 0,5 ml la șoarece sau pînă la 1-2 ml la cobai.

Inocularea intra-musculară. Pentru șoarece poate fi efectuată în mușchii coapsei iar pentru cobai în mușchii coapsei sau ai cefei. Se practică la fel ca și inocularea subcutanată acul fiind însă introdus în masa musculară. Se inoculează (cca 0,1-0,2 ml la șoarece și cca 1 ml la cobai) pe această cale toxine sau culturi microbiene. Este calea de elecție pentru cercetarea patogenității.



## ții clostridiilor.

Inocularea intra-peritoneală. Se efectuează sub-ombilical și paramedian. Acul se introduce pe o distanță de cca 1 cm subcutanat apoi se dă o înclinare spre verticală și se perforează peretele muscular. Se inoculează cca 1 ml la șoarece și câțiva ml la cobai. Este o cale de inoculare severă folosită în general pentru produse patologice monomicrobiene.

Inocularea intra-venoasă se practică la șoarece în venele cozii, la cobai în vena safenă internă iar la iepure în vena marginală a urechii.

### (4) Supravegherea animalelor inoculate

Supravegherea animalelor inoculate se face urmărind

- starea generală (poziția, aspectul părului),
- temperatura,
- greutatea,
- leziunile ~~de la~~ de la locul de inoculare, inclusiv starea ganglionilor limfatici regionali,
- tulburări nervoase (convulsii, paralizii),
- tulburări digestive etc.

Aceste observații se completează, după caz, cu examenul anatomo-patologic și bacteriologic al animalului necropsiat (mort spontan sau sacrificat).

Dacă a fost inoculată o bacterie virulentă, animalele fac o boală septicemică mortală. În acest caz, obiectivul final este evidențierea bacteriei respective în sânge (hemocultură) și organe (examenul microscopic al amprentelor de splină, ganglioni etc.).

Dacă a fost inoculată o bacterie toxigenă sau numai toxina acesteia animalele fac o toxiinfecție, respectiv intoxicație. Inocularea în paralel a unui animal protejat cu ser antitoxic permite, pe baza înaltei specificității a reacției de neutralizare, identificarea precisă a bacteriei toxigene inoculate. Animalul neprotejat moare cu semnele caracteristice intoxicației iar dintre animalele protejate cu ser antitoxic supraviețuiește doar a-



cela care este protejat cu serul corespunzător toxinei inoculate.

### (5) Necropsia

Animalele sînt necropsiate în maximum 1-2 ore după moarte sau sacrificare pentru a evita invadarea organismului de către flora de putrefacție.

#### Material necesar

- tavă de tablă cu margini perforate pentru fixarea animalului (cobai, iepure); pentru fixarea șoarecilor se poate utiliza o simplă planșetă de scîndură;
- instrumente de mică chirurgie (3 bisturie, 4 penze anatomice, 4 foarfece, sonde canelate) sterilizate;
- soluție 1% bromocet, alcool iodat, vată;
- cutii Petri sterile, pipete Pasteur, lame de microscop, ansă, medii de cultură (bulion glucozat, geloză sînge etc.), lampă de spirt sau bec de gaz;
- mănuși pentru cazul în care se necropsiază animale inoculate cu bacterii foarte patogene.

#### Necropsia

Animalul de necropsiat se fixează pe tava de necropsie cu fața ventrală în sus. Șoarecele mort poate fi fixat pe planșeta de lemn cu bolduri trecute prin lăbuțe.

Se badijonează insistent toată fața ventrală cu soluție 1% bromocet. Prin aceasta nu sînt distruse în totalitate microorganismele de la suprafața corpului dar este prevenită eficient contaminarea aerului și suprafețelor cu praful și perii din blană în cursul incizării tegumentelor.

Cu un rînd de instrumente sterile (foarfece, pensă, sondă canelată) se face o incizie mediană a tegumentelor submetopubiană și cîte 2 incizii spre rădăcina membrilor (fig. 31 A). Se decolează pielea pînă pe flancuri. Se examinează țesutul celular subcutanat, masele musculare și ganglionii limfatici, în special ai regiunii inoculate.

Cu un nou rînd de instrumente sterile se face o incizie transversală paralelă cu rebordul costal și 2 incizii laterale secționînd coastele. Se ridică plastronul costal. Se evidențiază astfel organele toracice.



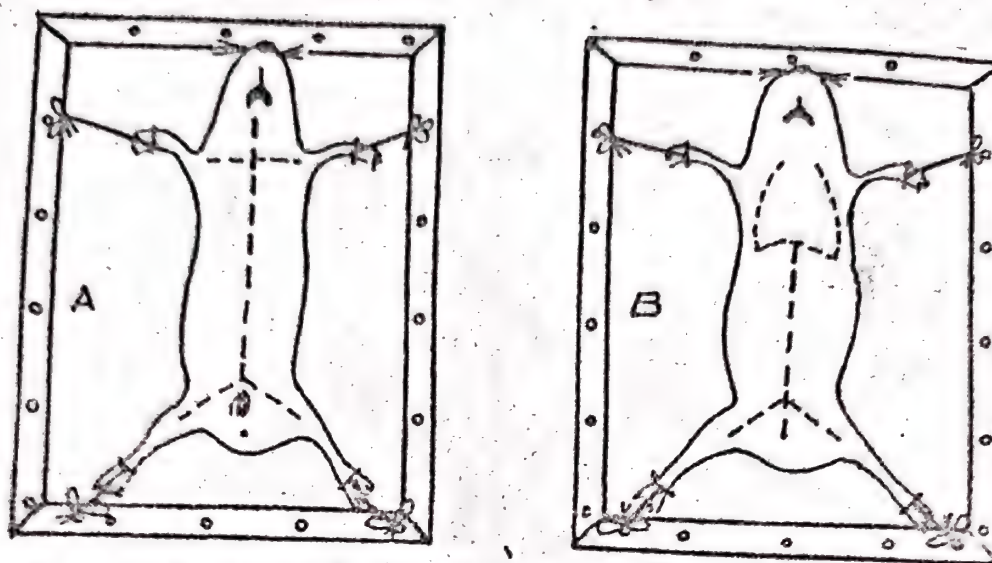


Fig.31 Fixarea animalelor de laborator pentru necropsie  
A - traiectul inciziilor tegumentului; B - traiectul inciziilor planului musculo-aponevrotic pentru deschiderea cavităților toracică și abdominală

Pentru hemocultură, se imobilizează vârful cordului cu pensa și se puncționează cu o pipetă Pasteur, după cauterizarea suprafeței de puncție cu o spatulă. Se recoltează o cantitate de sânge, care se ridică prin capilaritate în pipetă, și se însămânțează în bulion glucozat și pe geloză sânge.

Se deschide apoi abdomenul (fig.31 B). Se examinează organele abdominale. Utilizând alt rînd de instrumente, se scoate splina și se depune într-un Petri steril. După caz, similar, sînt abordate și celelalte organe ale cavității abdominale (ficat, rinichi etc.) și toracelui. Organele recoltate se secționează steril și se fac însămînțări pe medii de cultură adecvate și amprente pentru examenul microscopic.

După necropsie, cadavrul este acoperit cu un tifon și totul bine umezit cu soluție dezinfectantă. În final este incinerat. Instrumentarul, tăvile de necropsie și gălețile în care au fost transportate cadavrele sînt sterilizate prin autoclavare sau fierbere prelungită.



## PARTEA A TREIA

### REACTII ANTIGEN-ANTICORP

Antigen este orice substanță care (a) ajunsă în organismul animal stimulează formarea de anticorpi cu care (b) este capabilă să reacționeze (să se cupleze) specific atât *i n v i v o* cât și *i n v i t r o*.

Anticorpii sînt atât imunglobuline cât și limfocite specific sensibilizate purtătoare de sedii de „recunoaștere” și cuplare specifică (fig.32) elaborate de sistemul imunoformator ca urmare a pătrunderii în organism a unui antigen.

Mecanismul cuplării antigen-anticorp. Cînd antigenul și anticorpul corespunzător sînt puși în contact, între grupările determinante și zonele de combinare se stabilesc legături multiple (forțe de atracție electrostatică, forțe van der Waals, punți de hidrogen) favorizate de complementaritatea structurală (fig.33).

Prin realizarea legăturii antigen-anticorp numărul grupărilor polare hidrofile se reduce; complexul devine sensibil la acțiunea floculantă a electroliților.

Antigenul și anticorpul se unesc în proporții variabile datorită polivalenței antigenului și bivalenței anticorpului (IgG). Proprietățile complexului format diferă cu raportul cantitativ dintre antigen și anticorp (fig.34).

În zona de echivalență rămîn nesaturate atât valențe ale antigenului cât și ale anticorpului. Complexul format se poate mări prin adăugarea de noi și noi molecule de antigen și anticorp. El prezintă o structură spațială în care numărul grupărilor polare este considerabil redus.



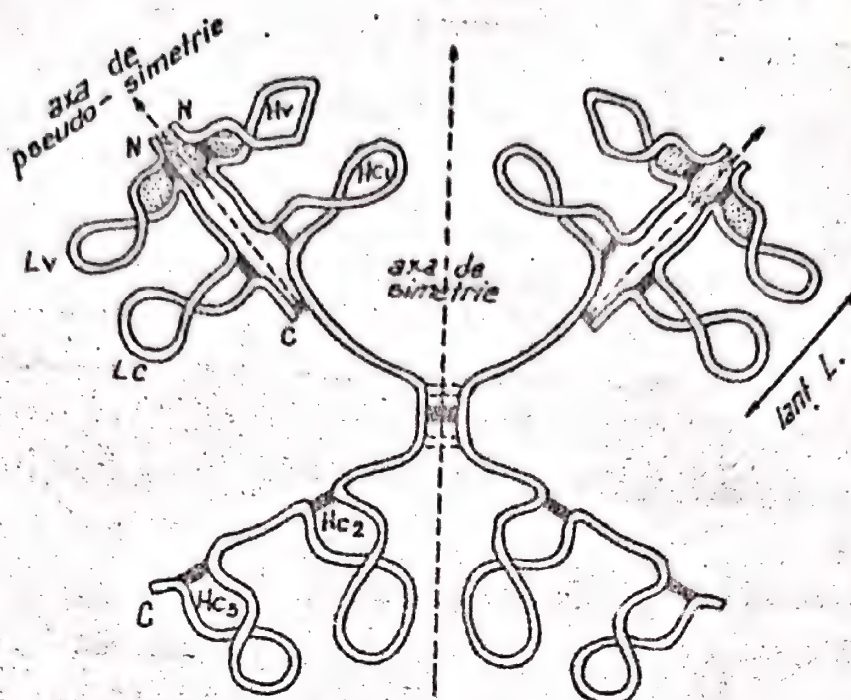


Fig.32 Prezentare schematică a moleculei de imunoglobulină G (după Raynaud, 1971): H=lanțul polipeptidic greu; L=lanțul polipeptidic ușor; v=zonă variabilă; c=zonă constantă; N=azot terminal; ■=punți S-S; ----=punți S-S cu poziție variabilă la diferite clase de Ig; în gri limita „poziției anticorp” (zonei de cuplare)

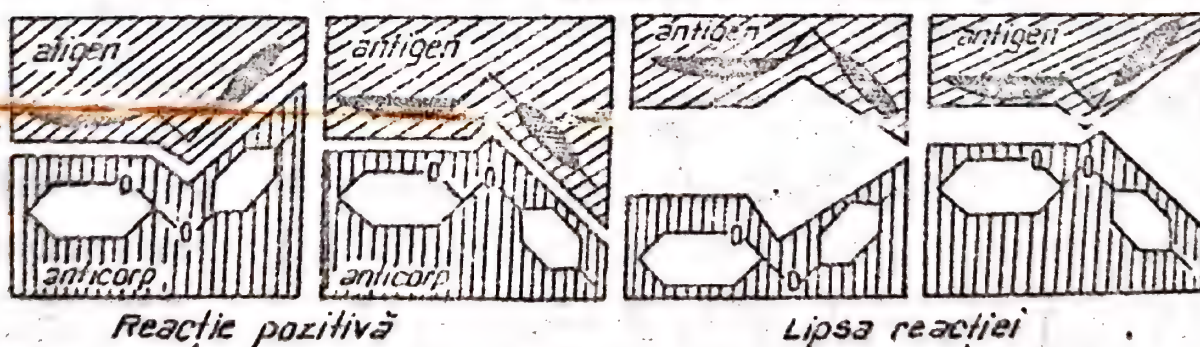


Fig.33 Cuplarea specifică antigen-anticorp (schematic)



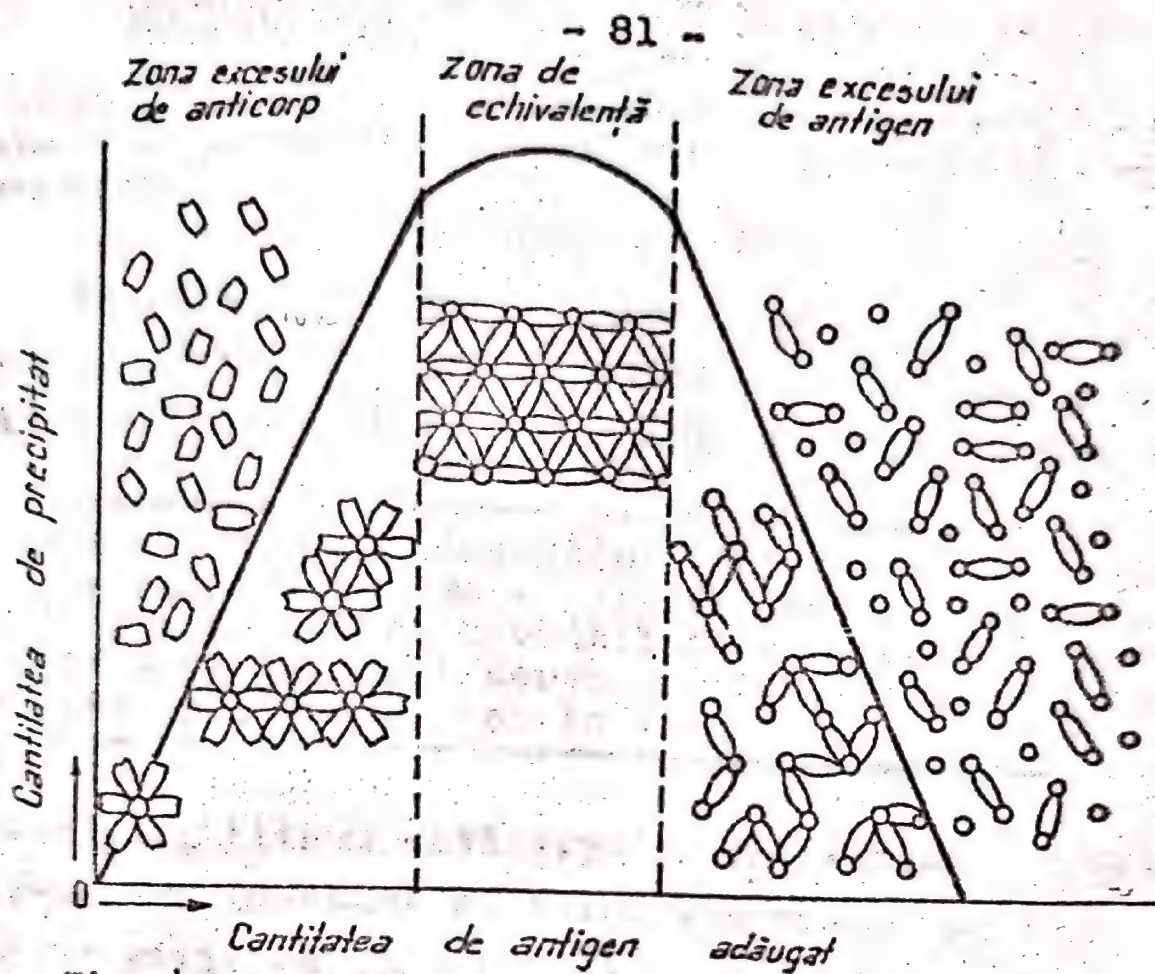


Fig. 34 Semnificația raporturilor cantitative în reacția antigen-anticorp

În consecință, sensibilitatea sa la acțiunea floculantă a electrolitilor este maximă. În zona de echivalență capacitatea complexului de a fixa complementul este maximă iar neutralizarea unei toxine prin antitoxina corespunzătoare este totală.

În zona excesului de anticorpi sau a excesului de antigen rămân nesaturate valențe ale elementului în exces. Complexele formate prezintă o structură spongioasă, au o sensibilitate mai redusă la acțiunea floculantă a electrolitilor. În aceste zone cantitatea precipitatului format scade proporțional cu excesul de antigen sau anticorp. De asemenea capacitatea complexului de a fixa complementul.



Aplicațiile reacției antigen-anticorp decurg din specificitatea ei:

(i) Un antigen necunoscut poate fi identificat prin anticorpii corespunzători cunoscuți.

În acest scop se utilizează seruri imune de referință.

Este și cazul identificării antigenice a microbilor. De exemplu:

<u>Ag</u>	+	<u>Ac</u>	= reacție +	(Ag este
(necunoscut,		(antitoxic,		bacil
bacil)		de exemplu)		tific)
			= reacție -	(Ag nu es-
				te bacil
				tific)

(ii) Un anticorp necunoscut poate fi identificat prin antigenul corespunzător cunoscut.

Este cazul diagnosticului serologic al bolilor infecțioase când microbul în cauză este identificat indirect prin anticorpii a căror apariție a determinat-o.

Rezultatul reacțiilor antigen-anticorp este influențat de proporția antigenului și anticorpului din amestec, de viteza cu care sînt amestecați reactivii, de prezența electroliților, de pH, temperatura de incubare a reacției



g.a. De aceea pentru a obține rezultate reproductibile trebuie să se lucreze în condiții standard care trebuie strict respectate.

Reacțiile antigen-anticorp pot fi executate calitativ și cantitativ. Reacțiile cantitative permit evaluarea titrului anticorpilor prezenți într-un ser.

Prin titrul anticorpilor într-un ser se înțelege diluția maximă a serului care mai dă o reacție pozitivă cu o cantitate cunoscută, constantă a antigenului corespunzător. El se exprimă printr-o fracție ordinară.

De exemplu, titrul anticorpilor antitifici 0 1/400 într-un ser înseamnă că serul respectiv mai dă o reacție pozitivă cu o cantitate cunoscută, constantă, de antigen tifoid 0 până la diluția 1/400.

Tipuri de reacții antigen-anticorp în funcție de natura antigenului și de modalitățile tehnice de evidențiere a reacției antigen-anticorp in vitro deosebim:

- Reacția de precipitare, care se produce între un antigen în soluție coloidală și anticorpul corespunzător și are ca rezultat insolubilizarea antigenului cu apariția unui precipitat sau flocculat.

- Reacția de aglutinare are loc între un antigen integrat în structura unei celule și anticorpul corespunzător. Rezultatul reacției este constituirea



unui agregat vizibil de celule (de exemplu, bacterii), aglutinat care se depune la fundul tubului cu clarificarea consecutivă a supernatantului.

- Reacția de fixare a complementului.

- Reacții cu anticorpi marcați în care cuplarea antigenului cu anticorpul se vizualizează în preparate microscopice folosind anticorpi marcați fluorescent (microscopie în ultraviolet) sau cu substanțe electronoopace (microscopie electronică).

Reacții de neutralizare a unor toxine microbiene sau a unor exoenzime.



## 6 CERCETAREA STRUCTURII ANTIGENICE A BACTERIILOR

Pentru cercetarea structurii antigenice a microbilor (identificare antigenică) se utilizează truse cu seruri de referință - seruri cu anticorpi cunoscuți.

Seruri monospecifice. Microbi din specii diferite pot poseda un antigen comun. Astfel, un ser imun corespunzător unei specii aglutinează, precipită ș.a. atât suspensii și respectiv extracte antigenice ale speciei omoloage cât și ale tuturor bacteriilor cu care aceasta posedă antigene comune. Aceste reacții se numesc reacții încrușate.

Să presupunem că bacteria 1 are configurația antigenică X Y Z, bacteria 2 - M N Z, iar bacteria 3 - T U Z. Serul imun obținut prin inocularea bacteriei 1 la un animal de experiență conține anticorpi anti-X, anti-Y și anti-Z. Posedând anticorpi anti-Z, acest ser va aglutina suspensiile tuturor bacteriilor care posedă antigenul Z (bacteriile 1, 2, 3 ș.a.). La fel, va precipita cu extracte antigenice ale acestor bacterii.

Dacă aglutinatul care apare când se suspendează bacteria 2 în serul imun corespunzător bacteriei 1 este îndepărtat prin centrifugare, odată cu bacteria 2 sînt îndepărtați din ser și anticorpi anti-Z. Această operație se numește absorbția anticorpilor. Ea poate fi repetată pînă în momentul în care serul imun anti-bacteria 1 nu va mai reacționa cu bacteria 2 sau cu orice altă bacterie care conține antigen Z. Un asemenea ser este un ser monospecific; el reacționează numai cu bacteria omoloagă.



Serurile monospecifice sînt seruri imune de referință. Ele se obțin din seruri imune native prin absorbția anticorpilor heterologi.

✓ (1) Gruparea serologică a streptococilor  $\beta$ -hemolitici prin reacția de precipitare inelară

Material necesar

- tuburi de precipitare ( tuburi de sticlă cu calibrul de 3-4 mm) și stativ,
- pipete Pasteur,
- extract antigenic streptococic (prepararea acestui extract după metoda Lancefield este schematizată în fig. 35),
- seruri imune anti-streptococice de grup A, C, G.

Tehnica

- Se pipetează, separat, în 3 tuburi de precipitare câte o mică cantitate (cca 0,1 ml) din serurile anti-streptococice de grup A, C, G.
- Se pipetează cca 0,1-0,2 ml din extractul antigenic în fiecare tub, deasupra serului, cu grija ca cei 2 reactivi să nu se amestece, astfel încît limita de separare să rămînă bine vizibilă.
- Citirea se face pe fond negru după cîteva minute. În tubul care conține antiserul omolog antigenului testat apare un precipitat lăptos inelar la limita dintre cei doi reactivi. În celelalte



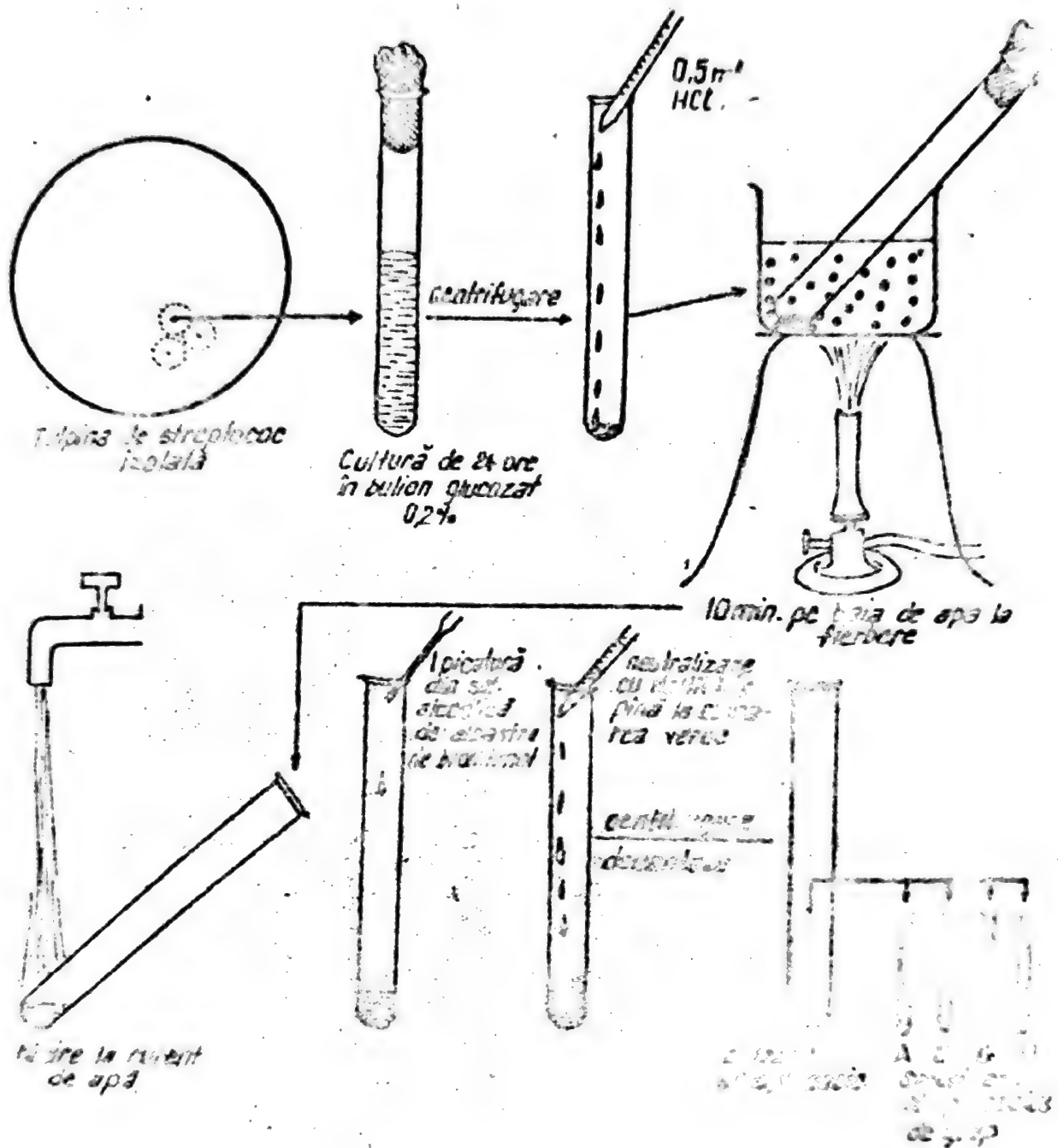


Fig. 35 Gruparea necropsică a streptococilor prin metoda Lamberfield



te tuburi nu trebuie să apară precipitare, reactivii rămân perfect clari<sup>\*)</sup>.

Notă

1 - Dacă cultura din care se prepară extractul nu este pură pot apare rezultate fals pozitive sau fals negative.

2 - Extractul antigenic trebuie neutralizat imediat deoarece polizaharidul streptococic de grup nu este stabil în mediu acid.

3 - Dacă extractul antigenic nu este bine neutralizat pot apare reacții fals negative.

4 - Reactivii trebuie să fie perfect clari.

(ii) Depistarea și identificarea prin reacția de precipitare inelară a antigenelor bacteriene în lichidul cefalo-rahidian (lcr)

Prin reacția de precipitare inelară se poate stabili diagnosticul etiologic al unor meningite bacteriene atunci când culturile rămân negative.

Material necesar

- tuburi de precipitare,
- pipete Pasteur,
- seruri anti-bacteriene (seruri anti-meningococice, anti-Haemophilus influenzae ș.a.),
- lcr: supernatantul perfect clar după centrifugare 5 min. la 3000 rpm.

<sup>\*)</sup> vezi nota de la subsolul pag.89



### Tehnica

Se efectuează o reacție de precipitare inelară în condițiile descrise mai sus (vezi punctul i).)

(iii) Demonstrarea in vitro a toxigenezei bacilului difteric prin metoda imunodifuziei (testul Elek)

Intr-o cutie Petri se repartizează un mediu favorabil cultivării și toxigenezei bacilului difteric (de exemplu, geloză nutritivă cu 20% ser normal de cal). De-a lungul unuia din diametrele plăcii se aplică o bandă de hîrtie de filtru de 1 cm/8 cm sterilă și îmbibată cu ser antidifteric (nefenolat) conținînd minimum 500 UA/ml. După ce se usucă suprafața mediului, perpendicular pe direcția

Reacția se poate efectua mai economic în tuburi capilare (1-1,2 mm diametru/ 75-100 mm lungime). Se introduce extremitatea capilarului în serul imun și se absoarbe prin capilaritate o coloană de cca 2 cm. Se șterg cu grijă urmele de ser de la exteriorul tubului pentru a nu degrada antigenul. Se introduce aceeași extremitate a tubului în extractul antigenic și se absoarbe o cantitate egală. Se șterg urmele de antigen de la exteriorul tubului. Se plantează tubul, cu coloana de ser în sus, în plasă astfel încît deasupra și dedesubtul coloanei de reactiv să existe un spațiu cu aer. Se repetă operația pentru fiecare ser imun din baterie. Citirea se face după 15-30 min. la temperatura camerei, cu ochiul liber sau cu lupa de mîna pe fond negru: se urmărește apariția inelului de precipitare. Citirea finală se face după menținerea 2 ore la 37°C și peste noapte la frigider: se urmărește existența unui precipitat la partea inferioară a coloanei sau pe pereții tubului.



### Tehnica

Se efectuează o reacție de precipitare inelară în condițiile descrise mai sus (vezi punctul i).)

(iii) Demonstrarea in vitro a toxigenezei bacilului difteric prin metoda imunodifuziei (testul Elek)

Intr-o cutie Petri se repartizează un mediu favorabil cultivării și toxigenezei bacilului difteric (de exemplu, geloză nutritivă cu 20% ser normal de cal). De-a lungul unuia din diametrele plăcii se aplică o bandă de hîrtie de filtru de 1 cm/8 cm sterilă și îmbibată cu ser antidifteric (nefenolat) conținînd minimum 500 UA/ml. După ce se usucă suprafața mediului, perpendicular pe direcția

\*) Reacția se poate efectua mai economic în tuburi capilare (1-1,2 mm diametru/ 75-100 mm lungime). Se introduce extremitatea capilarului în serul imun și se absoarbe prin capilaritate o coloană de cca 2 cm. Se șterg cu grijă urmele de ser de la exteriorul tubului pentru a nu degrada antigenul. Se introduce și extremitatea a tubului în extractul antigenic și se absoarbe o cantitate egală. Se șterg urmele de antigen de la exteriorul tubului. Se implantează tubul, cu coloana de ser în sus, în plas-tilină astfel încît deasupra și dedesubtul coloanei de reactiv să existe un spațiu cu aer. Se repetă operația pentru fiecare ser imun din baterie. Citirea se face după 15-30 min. la temperatura camerei cu ochiul liber sau cu lupa de mîna pe fond negru: se urmărește apariția inelului de precipitare. Citirea finală se face după menținerea 2 ore la 37°C și peste noapte la frigider: se urmărește existența unui precipitat la partea inferioară a coloanei sau pe pereții tubului.



benzii de hîrtie ımbibată cu antitoxină se ınsămın-  
țează cîte o strie din fiecare cultură de cercetat,  
un martor pozitiv și unul negativ. Se incubează la  
37°C și se examinează placa după 24 și 48 ore. An-  
titoxina (anticorpul) și toxina (antigenul) difu-  
zează radial din depozitele respective și ın locul  
unde se ıntîlnesc ın proporții echivalente dau ar-  
curi de precipitare (fig.36).

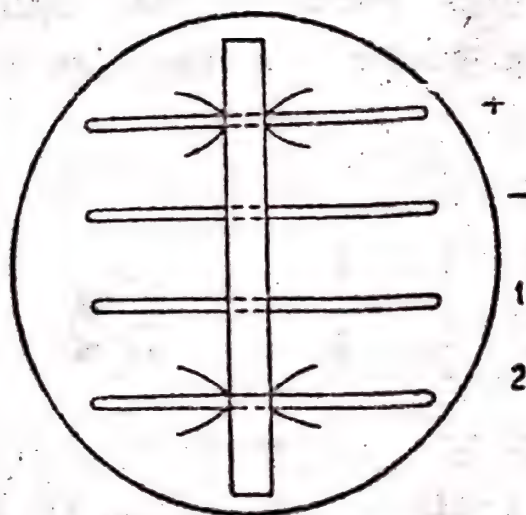


Fig.36 Evidențierea toxigenezei bacilului  
difteric prin reacția de imunodifuzie (tes-  
tul Elek): a-bandă de hîrtie de filtru ım-  
pregnată cu antitoxină difterică; + = cul-  
tură a unei tulpini toxigene cunoscute  
(martor pozitiv); - = cultură a unei tul-  
pini netoxigene cunoscute (martor negativ)  
1 = cultură testată (netoxigenă); 2 = cul-  
tură testată (toxigenă)



## (2) Reacția de aglutinare

### (i) Identificarea antigenică a bacteriilor prin reacția de aglutinare pe lamă

Este o etapă esențială în identificarea practică a unor bacterii, în primul rând a numeroaselor Enterobacteriaceae.

#### Material necesar

- lame de microscop,
- ansă,
- cultura pe mediu solid (geloză nutritivă sau medii diferențiale) a bacteriei de identificat,
- trusă de seruri imune<sup>\*)</sup> diluate la titrul aglutinant pe lamă.

#### Tehnica

Bacteria se testează succesiv față de seruri polivalente apoi față de serurile monovalente (monospecifice) cuprinse în serul polivalent cu care a aglutinat.

(-) La extremitățile unei lame de microscop se depune câte o picătură din serurile imune.

(-) În fiecare picătură, pe rând, se omogenizează o ansă de cultură. Cantitatea de cultură trebuie să fie suficientă pentru a da o suspensie cu densi-

<sup>\*)</sup> Amănunte privind trusele de seruri imune livrate de Institutul Cantacuzino, București în scopul identificării Enterobacteriaceae-lor și a altor bacterii sînt date în capitolele părții a V-a a cărții.



tate medie. Omogenizarea se face, fără a împrăştia picătura, cu mişcări lente ale ansei pentru a evita formarea de aerosoli contaminanţi.

- Aglutinarea pozitivă este vizibilă cu ochiul liber în timpul suspensiei culturii. Aglutinările mai tardive nu se iau în consideraţie.

- Lamele pe care s-a efectuat reacţia sînt depuse într-un vas cu soluţie dezinfectantă.

Microbul este identificat antigenic de către serul în picătura căruia apare aglutinarea. În restul picăturilor suspensia trebuie să rămînă omogenă (fig.37).

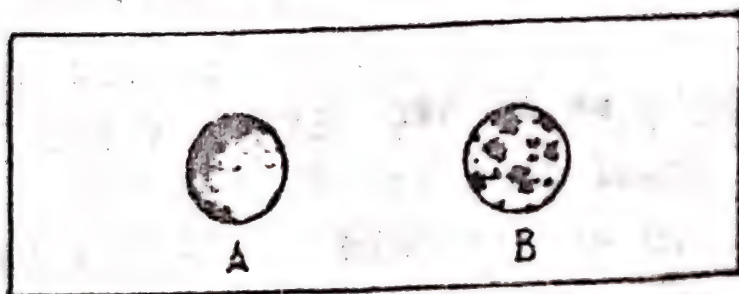


Fig.37 Reacţia de aglutinare pe lamă. A-reacţie negativă; B-reacţie pozitivă. În A ser anti-Salmonella grup A în B ser anti-Salmonella grup B. Bacteria studiată este deci o salmonellă grup B

Dacă în primele 2 picături se obţine consecutiv aglutinarea, cultura este autoaglutinabilă (forma R), fapt care se poate verifica prin suspensarea ei într-o picătură de sol. 1/500 acriflavină

în ser fiziologic. Reacţia nu se continuă cu restul serurilor - o asemenea cultură nu poate fi identificată antigenic prin reacţia de aglutinare.

Aglutinarea pe lamă este o reacţie de identificare orientativă. Pentru identificarea finală,



rezultatele ei se verifică prin aglutinarea în tub.

### (11) Reacția de aglutinare în tuburi

Prin aglutinare pe lamă se obțin uneori reacții încrucișate deoarece

- este imposibilă absorbția completă a anticorpilor responsabili de reacțiile încrucișate,
- titrul aglutinant pe lamă al serurilor imune este redus și nu permite diferențierea aglutinărilor prin anticorpii specifici de cele prin anticorpii responsabili de aglutinările încrucișate (incomplet absorbiți).

De aceea, pentru identificarea finală este necesar a efectua reacția de aglutinare în tub (reacție cantitativă și mult mai sensibilă) cu fiecare ser care a dat reacție pozitivă pe lamă.

In final, tulpina este identificată de serul care o aglutinează în tub până la titrul marcat pe fiolă.

### Material necesar

- tuburi de aglutinare (12/120 mm) și stativ,
- suspensia inactivată a bacteriei de identificat standardizată nefelometric,
- seruri de referință,
- ser fiziologic,
- pipete gradate (1 ml și 5 ml),
- baie de apă.

Inactivarea suspensiilor bacteriene se face diferențiat.

Pentru aglutinarea H: în tubul cu cultura de 18-24 ore în bulion nutritiv a bacteriei testate se adaugă ci-



teva picături de formol. Se ajustează cu ser fiziologic la o densitate de  $250-300 \cdot 10^6$  /ml (corespunzător tubului 1 din scara Brown).

Pentru aglutinarea O: cultura de 18-24 ore pe geloză înclinată a bacteriei testate este spălată cu cca 1 ml ser fiziologic care se transvazează apoi într-un tub steril și se inactivează 10 min. pe baia de apă la fierbere. Se ajustează cu ser fiziologic la o densitate de  $250-300 \cdot 10^6$  /ml.

### Tehnica

În exemplul pe care îl alegem bacteria testată a aglutinat pe lamă cu 2 din serurile monovalente (monospecifice).

- Se pun în stativ 2 șiruri a câte 9 tuburi de aglutinare, câte un șir pentru fiecare ser monospecific.

- În ambele șiruri se pipetează (cu pipeta de 5 ml) 0,9 ml ser fiziologic în primul tub și câte 0,5 ml în următoarele 8.

- Cu o pipetă de 1 ml, se pipetează 0,1 ml ser monospecific în primul tub al primului șir; se amestecă prin agitare; se obține astfel diluția 1/10 a serului respectiv.

- Cu o nouă pipetă de 1 ml, se trece din primul tub în al doilea 0,5 ml; se amestecă; cu aceeași pipetă se trec 0,5 ml din tubul al doilea în al treilea, se amestecă și tot așa până la tubul al 8-lea din care se aruncă 0,5 ml; sînt obținute astfel următoarele diluții de ser:



Nr. tub	1	2	3	4	5	6	7	8
Diluția serului	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280

- Se procedează la fel pentru diluarea celui de al doilea ser monospecific.

- Cu pipeta de 5 ml, se pipetează în toate tuburile câte 0,5 ml suspensie bacteriană. Se obțin astfel următoarele diluții finale ale serului de cercetat:

Nr. tub	1	2	3	4	5	6	7	8
Diluția serului	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560

- Tuburile se incubează la baia de apă. Temperatura și timpul de incubare variază cu antigenul (în general temperatura de incubare este de 37°C; timpul 2 ore pentru reacțiile cu antigene flagelare și 20 de ore pentru cele cu antigene somatice). Citirea reacției se face după scoaterea tuburilor de la baia de apă și menținerea lor 30 min. la temperatura camerei.

Pentru citirea reacției, fundul tuburilor se plasează deasupra unei oglinzi concave (de exemplu, o oglindă de microscop) sau se folosește un aglutinoscop.

In tubul martor suspensia bacteriană trebuie să fie omogenă.



Reacția pozitivă se traduce prin apariția unui aglutinat. Gradul de pozitivitate se notează după cum urmează:

++ = particule aglutinate sedimentate la fundul tubului; supernatant clar;

+ = bacteriile aglutinate în grunji vizibili cu ochiul liber; supernatant ușor opalescent;

± = aglutinare parțială vizibilă numai cu oglinda concavă sau la aglutinoscop;

= = aspect identic cu al matorului.

Diluția maximă la care mai apare o aglutinare (+) reprezintă titrul aglutinant al serului.

#### SCHEMA REACTIEI DE AGLUTINARE IN TUBURI

Tubul Diluția	1 $\frac{1}{20}$	2 $\frac{1}{40}$	3 $\frac{1}{20}$	4 $\frac{1}{160}$	5 $\frac{1}{320}$	6 $\frac{1}{640}$	7 $\frac{1}{1280}$	8 $\frac{1}{2560}$	Mator antigen
Antigen	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Ser de control	0,1								
Ser fiziologic	0,9	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

Incubare la 37° C 2 ore pentru reacțiile cu antigene flagelare și  
20 ore pentru reacțiile cu antigene somatice

Fig. 38



(3) Reacția de imunofluorescență directă în  
în identificarea rapidă a microbilor direct în  
produse patologice

Un frotiu care conține antigenul cercetat (de exemplu, o bacterie) este acoperit cu o soluție a anticorpului marcat. După timpul de incubație necesar, frotiul este spălat. Dacă reacția antigen-anticorp a avut loc, anticorpul marcat rămâne pe frotiu iar complexul antigen-anticorp respectiv este vizibil la microscopul cu fluorescență (fig.4o A).

Metoda directă este folosită în practica identificării rapide a unor bacterii direct în produse patologice pe baza structurii lor antigenice. Așa se poate face, de exemplu, identificarea tulpinilor enteropatogene de *Escherichia coli* în frotiuri din materii fecale.



În acest capitol ne limităm la conturarea cadrului serodiagnosticului, enumerarea reacțiilor utilizate cu principiul și indicațiile lor.

Cei interesați asupra amănunțelor tehnice vor putea consulta profitabil bibliografia indicată.

Anticorpul apar în umori ca urmare a unei infecții aparente (boală infecțioasă) sau inaparente. Ei pot fi decelați începând cu sfârșitul primei săptămâni de la debutul infecției. Odată apăruiți, titrul anticorpilor față de microbul infectant urmează o curbă ascendentă apoi descrește lent putând fi evidențiați luni și ani de zile după infecție; unii anticorpi persistă pentru toată viața.

Anticorpi pot să apară în umori și ca urmare a vaccinărilor.

La bolnavi cu sindroame febrile de origine necunoscută, cercetarea anticorpilor în ser se face în scopul stabilirii indirecte a diagnosticului etiologic al îmbolnăvirii - diagnostic indirect sau serologic (raporturile lui cu diagnosticul direct sau microbiologic ca și valoarea comparativă a celor 2 metode sînt prezentate cu detalii în capitolul 25 ).



Având în vedere că

în umorile oricărui individ normal există anticorpi în raport cu experiența sa infecțioasă (infecții aparente sau inaparente) și vaccinările pe care le-a făcut,

trebuie demonstrată legătura cauzală între anticorpii evidențiați și sindromul febril investigat. Cu rare excepții, aceasta se poate face numai examinând concomitent 2 probe de ser recoltate: prima cât mai curând posibil după diagnosticarea clinică a unei infecții (ser I sau ser precoce) și a doua după cca 10 zile de la prima recoltare (ser II sau ser tardiv).

Etiologia unei infecții este demonstrată prin examen serologic

- dacă anticorpii nu sînt prezenți în serul I dar își fac apariția în serul II

sau

- dacă titrul anticorpilor în serul II este de cel puțin 4 ori mai mare decît în serul I

Prin reacții *i n v i t r o*, cel mai frecvent se cercetează prezența precipitinelor, aglutininelor și anticorpilor fixatori de complement. Depistarea anticorpilor prin imunofluorescență este de asemenea o metodă utilă.



Alte categorii de anticorpi umorali - antitoxine, antihemolizine, antifibrinolizine - sînt mai rar cercetate din cauza inconstanței lor sau a dificultăților de punere în evidență. Depistarea lor este uneori utilă, cum este cazul antistreptolizinei O ca un criteriu secundar de diagnostic al reumatismului articular acut.

Prin reacții in vivo se cercetează în practica de rutină stările de sensibilizare față de unele antigene (inclusiv microbiene) precum și starea de sensibilitate (receptivitate) la unele toxine bacteriene și respectiv nereceptivitatea la aceste toxine prin existența anticorpilor neutralizanti.

#### (1) Reacții de precipitare în serodiagnosticul sifilisului

Deși anticorpii pot fi evidențiați prin reacții de precipitare în serurile bolnavilor suferinzi de o serie întreagă de bacterioze, în practică aceste reacții se utilizează numai pentru serodiagnosticul sifilisului. Se efectuează în paralel reacții de floculare (VDRL sau Kahn) și reacția de fixare a complementului cu antigen cardiolipinic.



## (2) Reacții de aglutinare

### (1) Diagnosticul unei febre enterice prin reacția de aglutinare

Infecțiile sistemice cu tablou clinic sugestiv pentru o febră enterică sînt determinate cel mai frecvent de Salmonella typhi, S. paratyphi A, S. paratyphi B, S. paratyphi C. Bruceloza poate mima simptomatologia unei febre enterice.

De aceea, serurile care provin de la un bolnav cu o infecție sistemică ce sugerează febra enterică sînt testate cu o baterie de antigene care include antigenele O și H ale S. typhi, S. paratyphi A, S. paratyphi B, S. paratyphi C și antigen Brucella.

Pentru economie de material și timp, în condițiile testării serurilor cu o baterie atît de largă de antigene, în practică se procedează la o testare preliminară de triaj. Serurile sînt testate în două diluții,  $1/20$  și  $1/200$ , față de antigenele Salmonella și în patru diluții,  $1/20$ ,  $1/200$ ,  $1/400$  și  $1/800$ , față de antigenul Brucella. Diluțiile sînt astfel alese pentru a evita un eventual fenomen de prozonă - mai frecvent cu anticorpii anti-Brucella - în cazul serurilor cu titruri mari de anticorpi (zona excesului de anticorpi). Retestarea într-o zonă mai largă de diluții se face numai față de antigenele cu care serurile au reacționat în testarea preliminară.



(ii) Alte utilizări ale reacției de aglutinare în serodiagnostic

Se recurge la reacția de aglutinare pentru diagnosticul serologic al tularemiei (aglutinarea unei suspensii de Francisella tularensis), al tifosului exantematic, tifosului murin ș.a.

Inrudierea antigenică existentă între majoritatea rickettsiilor și tulpinile X de Proteus<sup>\*)</sup> permite diagnosticarea unora dintre rickettsioze prin reacția de aglutinare în care se utilizează ca antigen suspensia de Proteus X - reacția Weil-Felix. Serurile bolnavilor de tifos exantematic și tifos murin aglutinează bine suspensia de Proteus X<sub>19</sub>.

În diagnosticul serologic al rickettsiozelor poate fi folosită și reacția de aglutinare specifică a antigenelor rickettsiene corpusculare spălate de antigenul solubil de grup. Aceste antigene însă nu sînt destinate serologiei de rutină.

(3) Reacția de fixare a complementului (RFC)

Complementul (C') sau alexina este un complex termolabil prezent în serul normal și care se adsoarbe, în prezența ionilor de calciu și magneziu, pe complexul antigen-anticorp. În absența complexului antigen-anticorp, C' nu se adsoarbe separat

•) Tulpinile X sînt o variantă „O” a speciei Proteus vulgaris



nici pe antigen, nici pe anticorp (fig.39).

Fixarea C' pe complexe antigenelor microbiene cu anticorpii omologi nu este vizibilă cu ochiul liber (bacterioliza care se produce în reacțiile cu unele bacterii - vibrionul holerio ș.a. - este dificil de urmărit).

Fixarea C' pe complexe hematiilor de oaie cu anticorpii omologi determină hemoliza, modificare vizibilă cu ochiul liber.

Adsorbția sau „fixarea” C' pe complexul antigen-anticorp poate fi evidențiată prin cuplarea în timpi succesivi a 2 reacții antigen-anticorp care își dispută C' ca element comun.

Intr-un prim timp se realizează reacția propriuzisă prin amestecarea antigenului și anticorpului cu o cantitate determinată de complement<sup>\*)</sup>. Amestecul este incubat pentru perioada de timp necesară desfășurării reacției (de exemplu, 1 oră la 37°C sau 18 ore la 4°C).

În al doilea timp este testată fixarea C' printr-un sistem indicator (sistemul hemolitic): suspensie de hematii de oaie-ser hemolitic antioaie

<sup>\*)</sup> Ca C' se folosește serul proaspăt sau conservat de cobai. Pentru ca la acțiunea C' introdus în reacție să nu se însumeze și acțiunea C' existent în serul de cercetat, se procedează în prealabil la inactivarea termică a serului timp de 30 min. la 56°C.



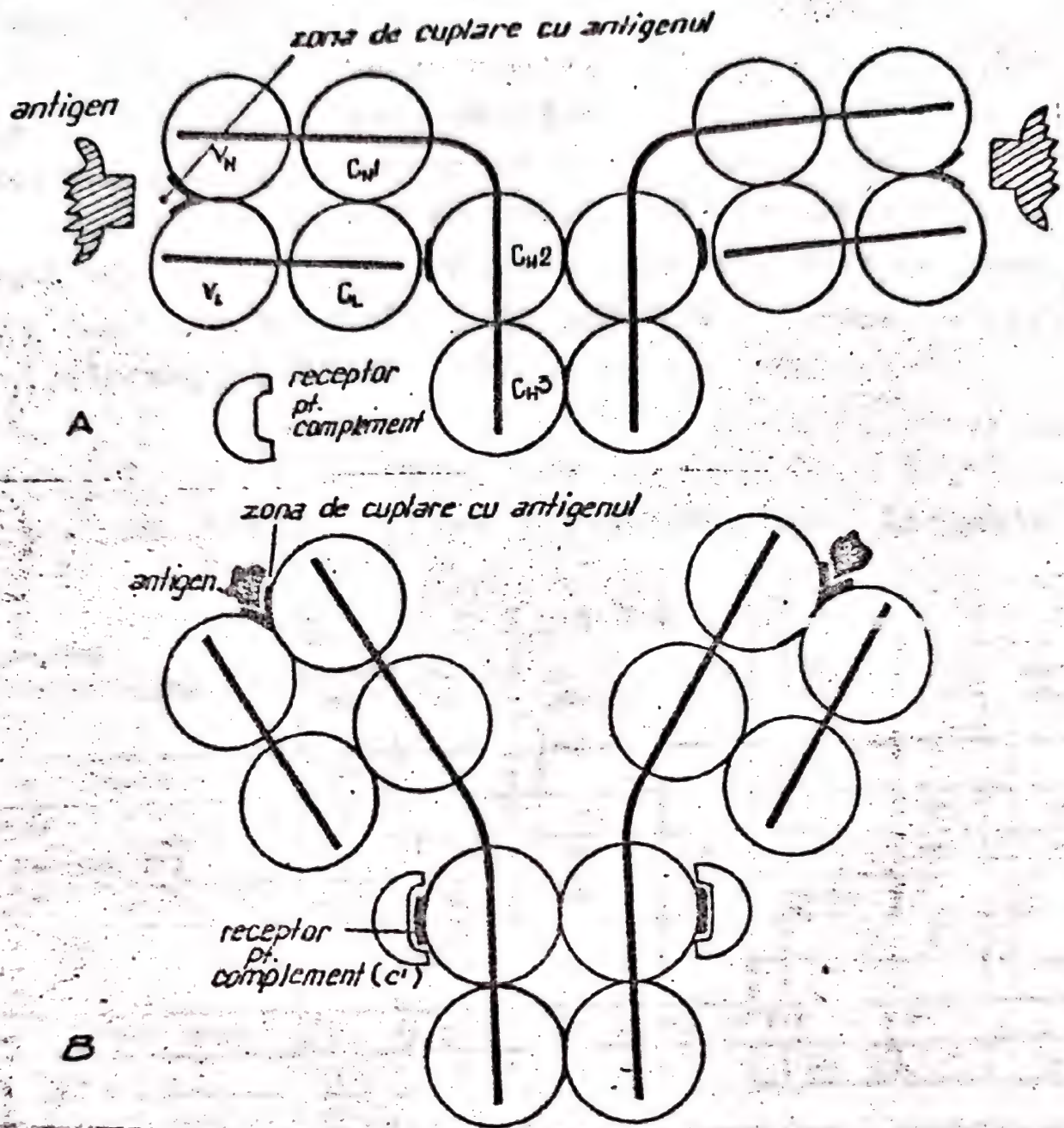


Fig. 39. Reprezentare schematică a mecanismului fixării C' pe complexul antigen (Ag)-anticorp (Ac):  
 A) Ag și Ac nu-și corespund; complexul Ag-Ac nu se formează; receptorul pentru C' din zona HC<sub>2</sub> rămâne mascat; C' rămâne liber. B) Ag și Ac își corespund; se formează complexul Ag-Ac. Prin cuplarea cu Ag, molecula Ac suferă o distorsiune prin care receptorul pentru C' este demascat; C' este fixat pe complexul Ag-Ac (după Edelman, 1970, modificat).



Testul este citit după o incubare de 30 min. la 37°C necesară desfășurării reacției de hemoliză.

Interpretare:

Dacă antigenul și anticorpul își corespund specific, în primul timp al reacției se formează complexul antigen-anticorp care fixează C'. În absența C' liber, în al doilea timp al reacției nu apare hemoliza: reacția este pozitivă.

Dacă antigenul și anticorpul nu-și corespund specific, C' rămâne liber după primul timp al reacției, la dispoziția sistemului indicator. Astfel, în al doilea timp al reacției apare hemoliza: reacția este negativă.

Reacția de fixare a complementului se vizualizează cu ajutorul cuplului hemolitic:

	Reacție +	Reacție -	
Ser de bolnav (anticorp)	+	-	Prima reacție
Antigen microbial	+	+	
Complement	+	+	A doua reacție
Hematii de oaie	+	+	
Ser hemolitic antioaie	+	+	
	Absență hemoliza	Hemoliză	

RFC permite și obținerea unor relații cantitative. În acest scop diluții succesive de ser sînt testate față de o cantitate constantă, cunoscută de antigen în prezența unei cantități de C' de aseme-










nea constantă și cunoscută. RFC cantitativă se poate efectua în tuburi sau, mai economic, pe plăci din material plastic ou godeuri.

Pentru ca în RFC să se obțină rezultate reproductibile de la o determinare la alta, este necesar a se luora în condiții standard controlate prin marteori adecvați (tabelul 2).

**Tabelul 2**

Schema reacției de fixare a complementului (reacția și marteorii necesari)

Legenda:	1	2	3	4	5	6	7
$+ = 1$ volum reactiv	Reacția propriu-zisă	Martor ser	Martor antigen	Martor C'	Martor cuplu hemol.	Martor pozitiv	Martor negativ
Ser de cercetat	+	+					
Antigen	+		+			+	+
Complement (C')	+	+	+	+		+	+
Diluent		+	+	++	+++		
Ser pozitiv						+	
Ser negativ							+
Incubare (prima reacție)	1 oră la 57°C sau 18 ore la 4°C						
Cuplu hemolitic	+	+	+	+	+	+	+
Incubare (a doua reacție)	30 min la 57°C						
Lectura reacției							
	Lipsa hemolizei	hemoliză	hemoliză	hemoliză	Lipsa hemolizei	Lipsa hemolizei	hemoliză

① - Reacția propriu-zisă: antigen + ser de cercetat + C' + sistem hemolitic. Reacție pozitivă = lipsa hemolizei; reacție negativă = hemoliză.



2 - Martorul ser: ser de cercetat + C' + sistem hemolitic.

Pentru ca RFC să poată fi interpretată, martorul ser trebuie să prezinte liză.  
Lipsa hemolizei la martorul ser semnifică existența în serul de cercetat a unor substanțe anticomplementare, serul este anticomplementar. Fenomenul este frecvent întâlnit la serurile contaminate.

În cazul anticomplementarității, RFC se repetă pe o nouă probă de ser.

3 - Martorul antigen: antigen + C' + sistem hemolitic. Verifică activitatea anticomplementară a antigenului. Hemoliză = antigenul nu este anti-C'; lipsa hemolizei = antigenul este anti-C', nu este corespunzător.

4 - Martorul complement: C' + sistem hemolitic. Verifică cantitatea de C' din reacție.

5 - Martorul pentru sistemul hemolitic: sistem hemolitic + diluent. Lipsa hemolizei = calitate corespunzătoare a hematiilor; hemoliză = calitate necorespunzătoare a hematiilor.

6 - Martorul pozitiv: ser pozitiv verificat în reacții anterioare + antigen + C' + sistem hemolitic = lipsa hemolizei. Titrul anticorpilor în serul pozitiv trebuie să se reproducă de la o reacție la alta.



(7) - Martorul negativ: ser negativ verificat în reacții anterioare + antigen + C' + sistem hemolitic = hemoliză.

RFC este larg aplicată în serodiagnosticul bacteriozelor (sifilisul în primul rând, apoi al leptospirozelor, gonocociilor cronice, brucelozei), rickettsiozelor, virozelor, a unor infecții fungice, cu protozoare sau a unor infestări cu helminți.

#### (4) Decelarea anticorpilor la bolnav prin imuno-fluorescentă

Se utilizează metoda indirectă (fig.4o B).

Un frotiu care conține un antigen cunoscut (de exemplu, Treponema pallidum) este acoperit cu serul de cercetat. Se incubează. Se spală.

Se acopere apoi cu o soluție de anticorpi anti-gama globulină umană marcați fluorescent.

Dacă în ser există anticorpi față de antigenul din frotiu (în exemplul dat anticorpi anti-treponemici) aceștia, după primul timp al reacției rămân fixați pe frotiu și fixează la rândul lor, în al doilea timp al reacției, anticorpii marcați anti-gama globulină umană, care fac complexul vizibil la microscopul cu fluorescență.



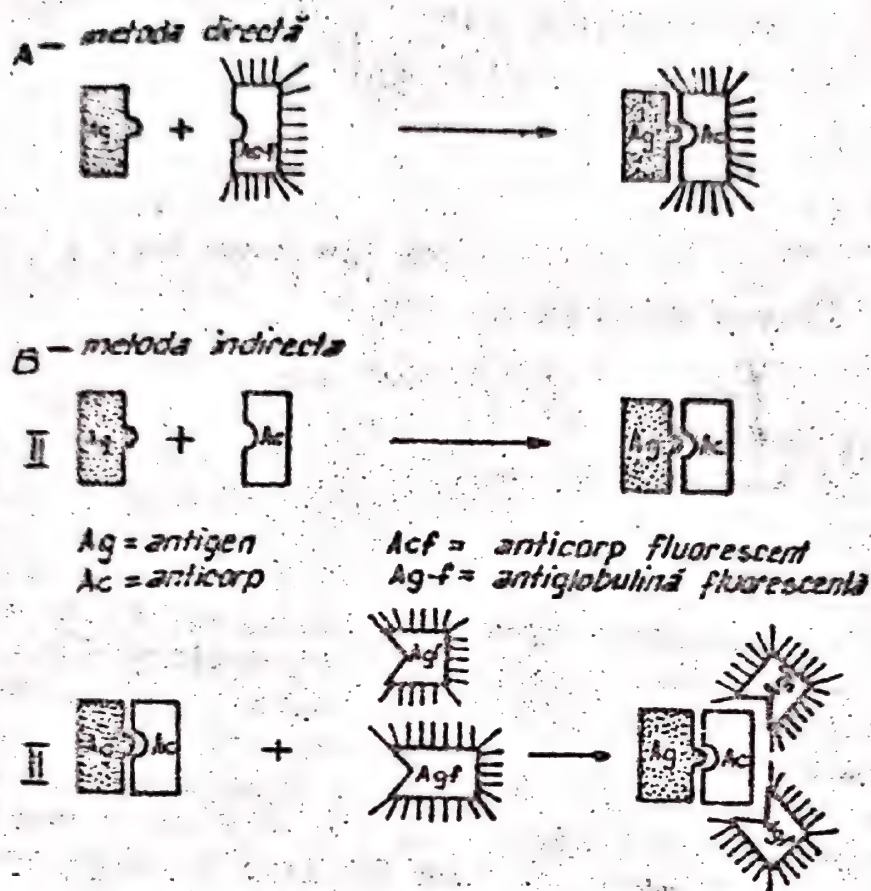


Fig.4c Principiul reacției de imunfluorescență.

#### (5) Decelarea stărilor de sensibilizare prin teste intra-dermice

În unele infecții cronice, atunci când examenul microbiologic a rămas negativ iar anticorpi umorali nu au putut fi decelați, cercetarea stării de sensibilizare poate aduce unele date utile pentru diagnostic. Cel mai frecvent este vorba de stări de sensibilizare de tip întârziat, mediate de anticorpi celulari, care se evidențiază prin inocu-



larea intra-dermică a unei mici cantități de antigen (culturi sau țesuturi infectate și inactivate, antigene purificate) - reacții intra-dermice (idr).

Starea de sensibilizare de tip întârziat se dezvoltă după 4-8 săptămâni de evoluție a infecției și persistă, după vindecarea bolii sau chiar sterilizarea organismului, ani de zile sau toată viața. De aceea rezultatele acestor teste trebuie interpretate cu anumită atenție.

O reacție negativă la un antigen exclude cu siguranță infecția prin microbul corespunzător (cu condiția ca pacientul să nu fie în cursul sau după un tratament cu imuno-supresive sau într-o stare de anergie fiziologică - sarcină - sau patologică - rușeolă, gripă etc.) Surprinderea virajului de la negativ la pozitiv a reacției față de un antigen aduce cert dovada etiologiei infecției.

Cel mai frecvent este utilizată idr la tuberculină pentru triajul în vederea vaccinării BCG (acest triaj nu este necesar pentru vaccinarea BCG a nou-născuților) și a diagnosticării unor forme de tuberculoză.

În țara noastră se utilizează tuberculina purificată "PPD-IC 65" care este livrată în două doze:

- doza I conține 2 UT/0,1 ml (fiole marcate cu roșu);
- doza II conține 10 UT/0,1 ml (fiole marcate cu albastru) și se utilizează numai pentru testarea persoanelor la care testul cu doza I a fost neconcludent.



Pe fața anterioară a antebrațului, în 1/3 mijlocie, după antiseptizarea tegumentului, se inoculează strict intra-dermic 0,1 ml din doza I (2 UT/0,1 ml). În acest scop se folosește o seringă etanșă de 1 ml, divizată în cu bizon scurt („seringă pentru tuberculină”). Injecția albă de edem cu diametrul de 5-6 mm care persistă cca 10 min.

Citirea reacției se face la 72 ore după inoculare. Se înregistrează diametrul maxim (în mm) al zonei de congestie și infiltrație care s-a dezvoltat la locul inoculării.

Interpretarea rezultatelor:

- Persoanele care la doza I nu dau nici o reacție sau prezintă reacții pînă la 9 mm inclusiv urmează a fi vaccinate (nu au făcut primoinfecția tuberculoasă, nu posedă anticorpi protectori - anticorpi celulari).

- Persoanele cu reacții peste 10 mm nu sînt vaccinate (au făcut primoinfecția tuberculoasă și posedă anticorpi protectori). Din această categorie, copiii (0-15 ani), care nu au fost vaccinați BCG și la testări anterioare nu au prezentat reacții cu această intensitate, vor fi supuși examenului radiologic pulmonar pentru depistarea eventualei infecții tuberculoase aparente.

- Persoanele cu reacții foarte intense după inocularea cu doza I (flictenă, ulceratie, necroză) - adulți sau copii - ca și persoanele la care s-a surprins un viraj brusc sau o intensificare a reacției sînt supuse investigațiilor radiologice și bacteriologice pentru depistarea tuberculozei.

- Dacă reacția rămîne negativă sau este sub 9 mm diametru și după testarea cu doza II, etiologia tuberculoasă a afecțiunii investigate poate fi exclusă.

Notă: retestarea cu doza II nu trebuie făcută la interval mai mare de 15 zile de la testarea cu doza I pentru a evita posibilitatea reacțiilor violente datorate infecției tuberculoase survenite într-un atare interval.



Ocazional se mai cercetează starea de sensibilizare de tip întârziat prin idr la brucelină pentru diagnosticul brucelozei, la maleină pentru diagnosticul morvei, la tularină pentru diagnosticul tularemiei.

Se mai recurge la idr pentru diagnosticul unor viroze (idr Frei pentru diagnosticul limfogranulomatozei inghinale), unor micoze (coccidioidoză, histoplasmoză). Pentru diagnosticul hidatidozei, unde se dezvoltă atât o sensibilizare de tip imediat cât și întârziat la antigenul hidatic, se poate recurge la idr Casoni cu lichid hidatic.

#### (6) Teste de sensibilitate la toxine și neutralizare intra-dermică

Inocularea intra-dermică a unor doze mici de toxina difterică sau de toxina eritrogenă streptococică la indivizi neimunizați determină reacții locale. (congestie ș.a). Inocularea aceluiași cantități de toxina la indivizi imuni nu este urmată de aparitia acestor reacții locale.

##### (1) Idr Schick pentru depistarea receptivității la difterie.

Toxina Schick este toxina difterică diluată pentru a conține 1/50 DLM pentru cobai/0,2 ml.

Pe fața anterioară a antebrațului drept, în 1/3 mijlocie, după antiseptizarea tegumentului, se inoculează intra-dermic 0,2 ml toxina. Ca martor, se inoculează, si-



similar, la antebrațul stâng 0,2 ml toxină inactivată 30 min. la 85°C.

Citirea reacției se face după 24-72 ore. Dacă este necesar se face o a doua citire după 5-7 zile.

a - Negativ: lipsa de reacție la ambele antebrațe.

b - Pozitiv: la nivelul testului, congestie care apare după 24-48 ore și crește pentru a atinge maximum între 4-7 zile. Lipsă de reacție la martor.

c - Negativ + pseudoreacție: congestie care apare după 24 ore și diminuează pentru a dispărea complet pînă în ziua a 4-a la ambele antebrațe.

d - Pozitiv + pseudoreacție: congestie după 24 ore la ambele antebrațe. Dispare repede la nivelul martorului, rămîne la nivelul testului spre a evolua așa cum s-a arătat la (b).

Interpretarea rezultatelor:

Cei cu reacție negativă sînt imuni (au în circulație cel puțin 1/30 u antitoxice - suficient pentru a-i proteja de toxinfecția difterică).

Cei cu reacție pozitivă sînt receptivi la difterie; trebuie vaccinați.

Cei negativi cu pseudoreacție sînt imuni și sensibilizați la antigene ale bacilului difteric.

Cei pozitivi cu pseudoreacție sînt receptivi la difterie și sensibilizați la antigene ale bacilului difteric; trebuie vaccinați dar cu doza fracționată.

(ii) Idr Dick pentru depistarea receptivității la scarlatină.

Toxina Dick este toxina eritrogenă a streptococului  $\beta$ -hemolitic grup A diluată pentru a conține 1 unitate reacțională cutanată (STD)/0,1 ml.

Pe fața anterioară a antebrațului drept, în 1/3 mijlocie, după antiseptizarea tegumentului, se inoculează intra-dermic 0,1 ml toxină Dick. Ca martor, se inoculează similar, la antebrațul stîng 0,1 ml toxină inactivată 2 ore la 100°C.

Citirea reacției se face după 24 ore.

a - Negativ: lipsă de reacție la ambele antebrațe.

b - Pozitiv: congestie și infiltrație cu diametrul



mai mare de la ea la nivelul testului. Lipsă de reacție la martor.

c - Negativ + pseudoreacție: congestie cu dimensiuni și aspect identice la ambele antebrațe.

d - Pozitiv + pseudoreacție: congestie mai intensă la nivelul testului decât la martor.

Interpretarea rezultatelor: cei cu reacție negativă sunt imuni la scarlatină iar cei cu reacție pozitivă sunt receptivi.

./.



## PARTEA A PATRA

### METODE DE LABORATOR IN CONDUCEREA ANTIBIOTERAPIEI





## 8 DETERMINAREA SENSIBILITATII BACTERIILOR LA ANTIBIOTICE (ANTIBIOGRAMA)

Sensibilitatea unei bacterii față de un antibiotic se testează *i n v i t r o* punînd-o în condiții optime și standardizate de cultivare (mediu de cultură, inoculum, timp de incubare etc.) în prezența unor cantități descrescînde ale antibioticului.

Cea mai mică cantitate de antibiotic care inhibă dezvoltarea bacteriei testate se numește concentrație minimă inhibitorie (CMI).

CMI caracterizează relația microb-antibiotic *i n v i t r o*.

*I n v i v o* în relația microb-antibiotic intervine al treilea factor: organismul bolnav. Concentrațiile de antibiotic activ care se realizează la nivelul focarului infectios sînt foarte diferite. Ele depind de (i) localizarea infecției, (ii) difuzibilitatea antibioticului în țesuturi și umori și de (iii) procesele de inactivare pe care antibioticele le pot suferi în organism.



Pentru necesitățile terapeutice, relația microb-antibiotic *i n v i v o* este caracterizată de raportul dintre concentrația de antibiotic activ care poate fi atinsă în focarul infecțios și CMI a antibioticului. Acest raport este cunoscut sub numele de nivel de eficiență inhibitorie (NEI).

În mod curent, raportarea se face la nivelul seriei medii al antibioticului - așa cum poate fi obținut prin posologia uzuală a drogului. În limitele acestor parametri, microbul infectant se definește

sensibil dacă CMI este de minimum 2-4 ori mai mică decât nivelul seriei medii al antibioticului; efectul terapeutic se obține cu dozele uzuale de antibiotic;

rezistent dacă CMI este mai mare decât nivelul seriei medii; efectul terapeutic nu se poate obține: antibioticul își manifestă efectele toxice pentru organism înainte de a putea atinge CMI;

moderat rezistent dacă CMI este apropiată de nivelul seriei medii; efectul terapeutic se poate obține numai cu doze mari de antibiotic sau prin administrarea sa locală.

Se înțelege că pentru cazuri particulare, cum sînt de exemplu infecțiile urinare, meningiene, CMI a microbului izolat se va raporta la concentrația antibioticului activ în aceste umori.



După modalitățile tehnice de realizare a gradientului de concentrații ale antibioticelor față de care se testează microbul de cercetat deosebit

- 1 - metoda diluțiilor și
- 2 - metoda difuzimetrică

Indiferent de metoda la care se recurge, testarea sensibilității la antibiotice a tulpinii de cercetat trebuie făcută în paralel cu cea a unei tulpini martor. Numai în acest mod se poate controla reproductibilitatea rezultatelor. Ca tulpini martor se folosesc tulpini de colecție, care și-au păstrat nealterat spectrul natural de sensibilitate la antibiotice, de exemplu:

- tulpina Oxford de Staphylococcus aureus (NCTC 6571) în cazul testării bacteriilor gram-pozitiv și
- Escherichia coli (NCTC 10.418) în cazul testării bacililor gram-negativ.

#### (1) Determinarea CMI prin metoda diluțiilor de antibiotic în tuburi

În 2 șiruri de tuburi se fac diluții duble ale antibioticului într-un mediu de cultură care permite cultivarea optimă a bacteriei testate fără a interfera cu activitatea antibiotică (mediul Mueller-Hinton, de exemplu). Diluțiile trebuie să meargă de la cea mai mare concentrație a antibioticului posibil de obținut în sînge pînă la o concentrație in-



ferioară CMI a tulpinii martor. În cazul în care se testează tulpini izolate din lor sau urină scara diluțiilor se adaptează concentrațiilor de antibiotic posibil de obținut în aceste umori.

Fiecare tub din primul șir este înșămîntat cu o cantitate constantă din cultura de 24 ore a bacteriei de testat (suspensie a culturii standardizată nefelometric).

Similar, fiecare tub din șirul al doilea este înșămîntat cu cultura tulpinii martor.

Obligator, testul trebuie însoțit de

- un martor pentru sterilitatea mediului (mediu neînșămîntat) și

- martori pentru cultivare (mediu fără antibiotic înșămîntat cu tulpinile testată și martor).

Tuburile sînt incubate la 37°C pînă în momentul în care opacitatea tuburilor martor pentru cultivare atestă apariția culturii (uzual peste noapte).

CMI a antibioticului pentru tulpina testată este dată de concentrația de antibiotic din ultimul tub fără creștere evidentă (fig.41).

CMI a tulpinii martor trebuie să se reproducă (+ sau - o diluție) de la o determinare la alta.

Dacă se efectuează numărătoarea germenilor viabili din tuburile fără cultivare evidentă, poate fi determinată concentrația minimă bactericidă (CMB), definită ca cea mai mică concentrație de antibiotic care distruge în proporție de 99,9-100% bacteriile





din inoculum inițial.

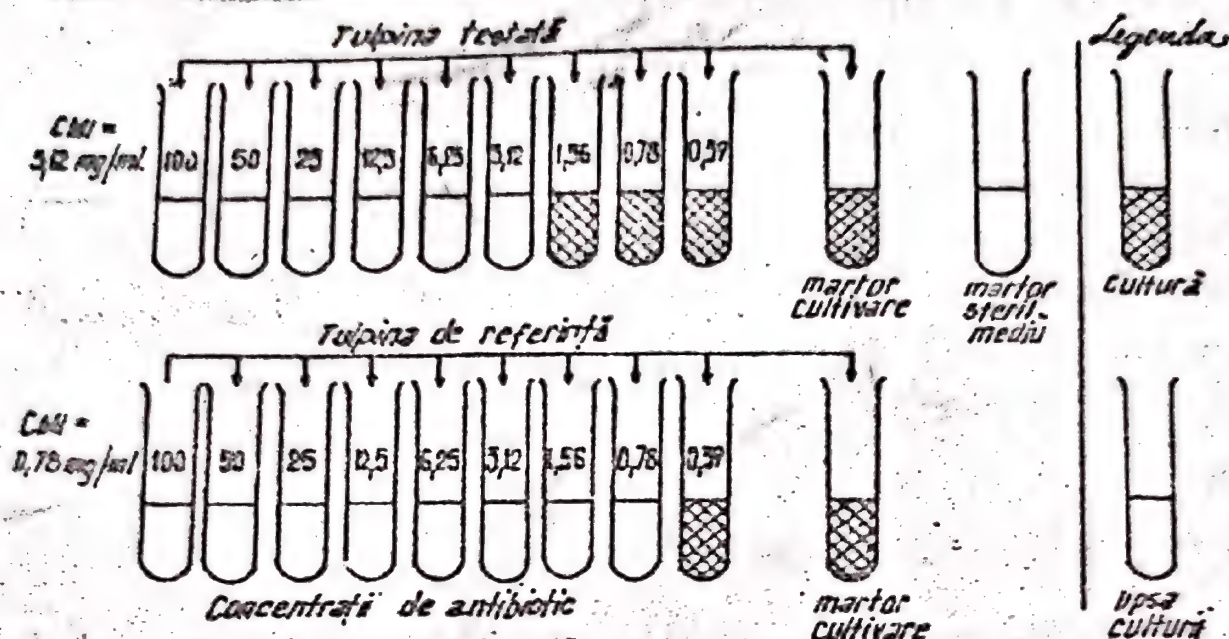


Fig.41 Determinarea CMI de antibiotic prin metoda diluțiilor

(2) În metoda difuzimetrică gradientul de concentrații necesar se realizează în mediu solid prin difuzarea antibioticului dintr-un depozit depus pe suprafața mediului într-o placă Petri după însămînțarea microbului de testat. Acest gradient scade proporțional cu distanța de la depozit. Cultura nu apare în aria în care antibioticul depășește CMI pentru microbul testat. Cu cât CMI este mai redusă cu atât aria de inhibiție apare mai mare și invers (fig.42).

Se folosesc rondela de hîrtie de filtru sau



microcomprimate<sup>\*)</sup> din care difuziunea antibioticului se face radiar. Pentru a recunoaște antibioticele, rondellele sau microcomprimatele sînt colorate diferit sau/și poartă inițiala antibioticului conținut. Cantitatea de antibiotic conținută/rondelă sau în microcomprimat este de ordinul de mărime al concentrațiilor posibil de obținut în organism în condiții terapeutice.

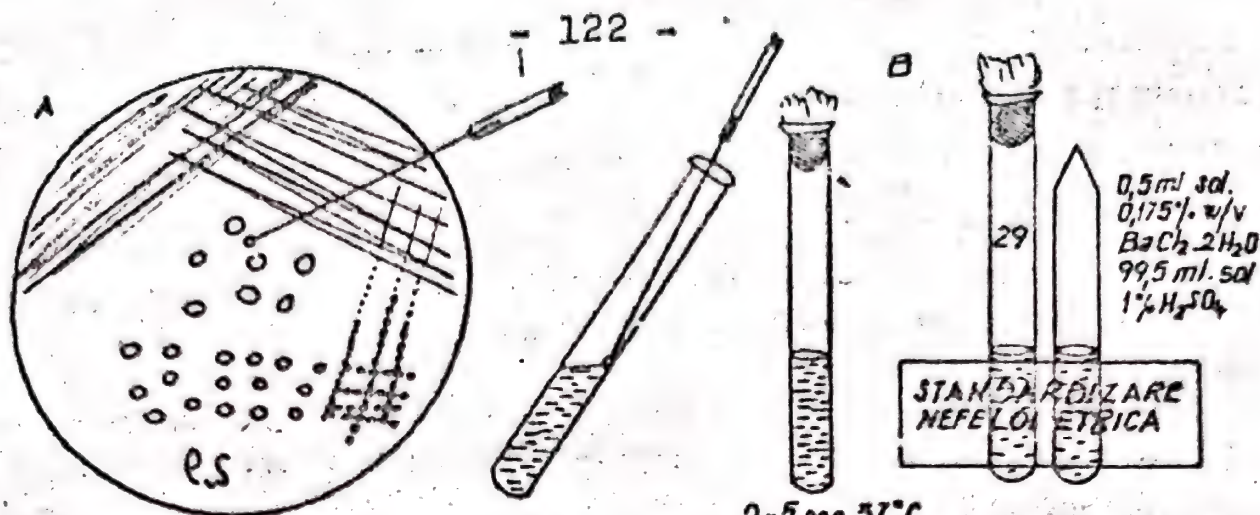
Prezentăm metoda difuzimetrică recomandată de Comitetul de Bacteriologie al Asociației de Patologie Clinică din Marea Britanie și de prof. Balș în țara noastră.

Intr-o placă Petri cu diametrul de 10 cm și cu fundul perfect plan se toarnă mediul de cultură, care trebuie să satisfacă necesitățile nutritive ale microbilor testați, să permită o bună difuziune a antibioticelor și să nu interfereze cu acțiunea lor (recomandăm mediul Mueller-Hinton).

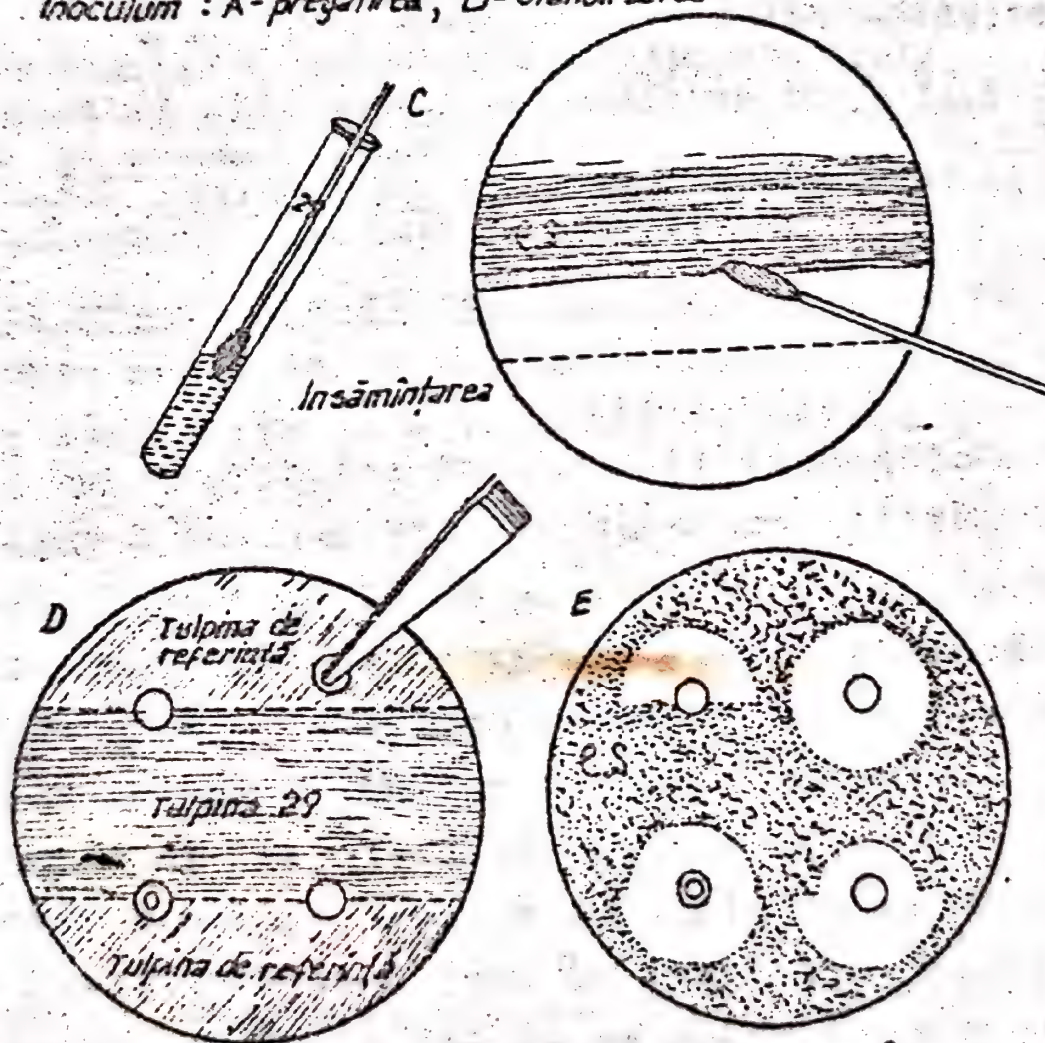
Cu ajutorul unui tampon se însămînțează uniform, cu bacteria testată, 1/3 mijlocie a plăcii. Tulpina de referință este însămînțată în mod similar în 1/3 superioară și inferioară (fig.42 o).

\*) La noi în țară, trusele cu microcomprimate pentru antibiogramme sînt livrate de Institutul pentru Controlul de Stat al Medicamentului. Se livrează truse de uz curent și truse pentru infecții stafilococice (concentrația de antibiotic/microcomprimat raportată la nivelul seric al antibioticului), truse pentru infecții urinare (incluzînd microcomprimate în care concentrația de antibiotic este raportată la concentrația urinară), truse pentru infecții locale.





2-5 ore 37°C  
Inoculum : A - pregătirea, B - standardizarea



D- Depunerea rondelilor  
 Lunganda P= penicilină  
 E= eritromicină  
 O= oxacilina  
 T= tetraciclina

E Citirea zonelor de inhibiție  
 Tulpina 29 F = rezistent  
 E = sensibil  
 O = sensibil  
 T = moderat rezistent

Fig.42 Antibiotograma difuzimetrică (schematic).



Inoculum trebuie să asigure o cultură cu colo-nii semiconfluente și trebuie să aibă aceeași densi-tate de la o determinare la alta. Pentru acest motiv se folosesc suspensii bacteriene standardizate.

Inoculum poate fi reprezentat de cultură tînă-ră (18-24 ore) a bacteriei testate izolată în prea-labil în cultură pură (fig.42 A), de unde numele de antibiogramă pe cultură secundară (ACS). În ACS standardizarea inoculum-ului se face nefelometric (fig.42 B).

În cazul produselor patologice monomicrobiene (lor, exsudate din cavitățile seroaselor, puroi din colecții închise ș.a.), cu o densitate suficientă a bacteriei infectante (apreciată microscopic), pen-tru antibiograma difuzimetrică se poate folosi ca inoculum însuși produsul patologic - antibiograma se face concomitent cu izolarea bacteriei infectan-te, de unde și numele de antibiogramă pe cultură primară (ACP). În cazul ACP standardizarea inoculum-ului (microscopică) rămîne aproximativă, dar este suficientă pentru necesitățile clinice cu-rente.

Rondellele sau microcomprimate cu antibiotico sînt depușe pe interliniile care separă suprafețele în-sămîntate cu tulpina test și cea de referință (fig.42 D).

După depunerea microcomprimatelor, plăcile sînt incubate cu capacul în jos la 37°C timp de 18-



24 ore.

Testarea bacililor gram-negativ se face față de: ampicilină, cephalotină, gentamicină, kanamicină, streptomycină, polimixină B, tetraciclină, cloramfenicol, acid nalidixic (numai în infecțiile urinare), nitrofurantoin (numai în infecții urinare). În cazul bacilului piocianic se va face și testarea pentru carbenicilină.

Testarea bacteriilor gram-pozitiv se face față de: penicilină G, cephalotină, eritromicină, gentamicină, kanamicină, streptomycină, tetraciclină, cloramfenicol.

În cazul stafilococilor se adaugă testarea față de meticilină (oxacilină), clindamicină.

În cazul enterococilor și altor streptococi  $\alpha$ -hemolitici se adaugă testarea față de ampicilină.

Citirea și raportarea rezultatelor. Se măsoară în mm raza zonei de inhibiție a culturii tulpinii testate comparativ cu a tulpinii de referință.) (fig.42 E). Densitatea culturii și viteza de creștere a celor 2 tulpini fiind echivalente și tulpina de referință sensibilă la antibioticele utilizate, se poate conchide despre tulpina testată că este

- sensibilă dacă raza ariei de inhibiție este egală sau mai mare decât a tulpinii de referință;
- moderat rezistentă dacă raza ariei de inhibiție este mai mică decât a tulpinii de referință;
- rezistentă dacă zona de inhibiție lipsește.

Așadar, în acest caz nu se poate raporta o valoare definită a CMI pentru tulpina testată ci se apreciază dacă aceasta este sau nu de același ordin

\* Diferențele de  $\pm 2$  mm nu sînt semnificative.



de mărime cu a tulpinii martor care este sensibilă la antibioticul respectiv.

Există și alte metode standardizate pentru efectuarea antibiogramelor difuzimetrice, cum este, de exemplu, metoda Kirby-Bauer în care testarea tulpinii cercetate și a celei de referință se fac pe plăci separate. În acest caz se apreciază diametrele zonelor de inhibiție care sînt raportate la tabele standard. În aceste tabele este indicat diametrul zonelor de inhibiție pentru tulpinile sensibile, moderat rezistente și rezistente în funcție de antibiotice și de categoria bacteriei testate (stafilococi, enterococi, Enterobacteriaceae, Pseudomonas ș.a.). Cei interesați asupra amănunțelor privind această metodă pot consulta cu folos bibliografia indicată.

Observații privind rezultatele metodei diluțiilor în tub și a celei difuzimetrice. Indicațiile celor 2 categorii de metode.

Metoda diluțiilor în tub dă informații precise privind CMI a antibioticului. Este însă laborioasă și costisitoare. Indicațiile acestei metode sînt:

(i) antibiograma tulpinilor izolate în hemo-culturi;

(ii) antibiograma tulpinilor izolate de la pacienți care nu răspund la o antibioterapie aparent adecvată (fie că nu răspund de la început, fie că fac recăderi).

Metoda difuzimetrică dă informații privind numai ordinul de mărime al CMI. Nu poate fi aplicată pentru bacteriile cu creștere lentă (Mycobacterium



tuberculosis ș.a.) (i) În schimb este o metodă facilă care permite testarea economică, concomitent față de mai multe antibiotice, a bacteriilor cu creștere rapidă. (ii) Permite efectuarea ACP. De aceea este metoda practicii de rutină.

În general, terapia antimicrobiană se face cu un singur antibiotic. Pentru conducerea tratamentului antimicrobian în circumstanțe care impun administrarea unei asociații de antibiotice (infecții mixte determinate de bacterii cu pattern diferit de sensibilitate, tratamente prelungite în care apare pericolul instalării rezistenței dobândite, endocardite subacute cauzate de bacterii rezistente la penicilină ș.a.), clinicianul se poate adresa laboratorului de microbiologie pentru testarea efectului antimicrobian al unor asociații de antibiotice (efect aditiv, sinergic sau antagonist, efect bactericid sau numai bacteriostatic). În acest scop laboratorul poate recurge la metoda diluțiilor în tub sau la metoda difuzimetrică. Cei interesați asupra amănunțelor tehnice pot consulta bibliografia indicată din care recomandăm în special pe Stokes (1968) și Buttiaux și colab. (1969).



## 9 CERCETAREA ANTIBIOTICELOR ÎN UMORI ÎN CURSUL ANTIBIOTERAPIEI

(1) Cercetarea antibioticelor în ser se face

- în infecții bacteriene severe: endocardite  
subacute, septicemii;

- după administrarea unui antibiotic nou sau  
pe o cale nouă;

- în cursul antibioterapiei (exceptând penicilina) la pacienți cu deficiențe funcționale renale (pericolul supra dozării).

Determinarea concentrației unui antibiotic în ser. Stabilirea nivelului de eficiență inhibitorie (NEI) sau bactericidă (NEB) a serului în cursul antibioterapiei.

Pentru determinările în ser, ca și în celelalte umori sterile, se recurge la metoda diluțiilor în mediu lichid.

Probele de sînge se recoltează steril și sînt  
imediat expediate la laborator unde este separat  
serul.

Înainte de începerea antibioterapiei se recoltează o probă care servește ca martor. După 24 ore de antibioterapie, timp necesar pentru stabilizarea ratei de absorbție și excreție a antibioticului, se recoltează probe pentru determinarea propriuzisă.





- 128 -

Dacă administrarea antibioticului se face discontinuă, recolta se face în momentul în care curba concentrației serice atinge minimum (imediat înaintea administrării următoarei doze de antibiotic).

Intr-un șir de tuburi se fac diluții duble ale serului în mediu Mueller-Hinton (uzual de la 1:2 la 1:128; pentru germenii foarte sensibili, cum este Streptococcus pyogenes, diluțiile pot să meargă până la 1:2048). Intr-un al doilea șir de tuburi se efectuează, în același mediu de cultură, diluții duble ale antibioticului administrat. Diluțiile de antibiotic vor acoperi o gamă de concentrații estimate ca posibil prezente în ser. Pentru a elimina eventualele interferențe între antibiotic și proteinele serice, pH etc. soluția mamă se face în proba de ser recoltată înaintea administrării antibioticului sau, în lipsă, în ser uman normal.

Toate tuburile sînt însămînțate cu tulpina izolată de la bolnav - inoculum standardizat: 0,05 ml din diluția 1/1000 a culturii de 6 ore în bulion în cazul bacteriilor cu creștere rapidă sau o ansă din cultura de 24 ore în bulion în cazul celor cu creștere lentă.

Pentru o determinare corectă, următorii marteori sînt obligatorii:

- martor pentru efectul antibacterian al umorii propriuzise: se însămînțează cu o tulpină verificată ca rezistentă la antibioticul testat oîte un tub din



- cea mai mică diluție a serului și antibioticului;
- martor pentru sterilitatea serului;
  - martor pentru sterilitatea mediului de cultură și a soluției de antibiotic;
  - martor pentru cultivarea tulpinii bacteriene test.

Toate tuburile se incubează peste noapte la 37°C

#### Citirea și raportarea rezultatelor

Citirea rezultatelor se poate face din momentul în care martorul pentru cultivarea bacteriană indică apariția culturii. Se identifică în ambele șiruri ultimul tub fără creștere evidentă<sup>\*)</sup>. Aici este realizată CMI a antibioticului. Din al doilea șir de tuburi aflăm valoarea CMI. Din primul, aflăm diluția de ser în care s-a realizat CMI. Produsul dintre CMI și inversul diluției de ser în care aceasta s-a realizat ne dă concentrația de antibiotic activ în ser (C).

În exemplul din fig.43 ultimile tuburi fără creștere evidentă sînt:

- tubul 5 din șirul 2, deci CMI a kanamicinei față de bacteria infectantă este 3 mcg/ml;
- tubul 3 din șirul 1, deci CMI s-a realizat în diluția 1:8 a serului, deci în serul nediluat

<sup>\*)</sup> Unele probe de ser fiind opalescente este precaut a se face pasaje din fiecare tub pe cîte un sector al unei plăci cu mediu de cultură.



sînt  $3 \times 8 = 24$  mg kanamicină/ml.

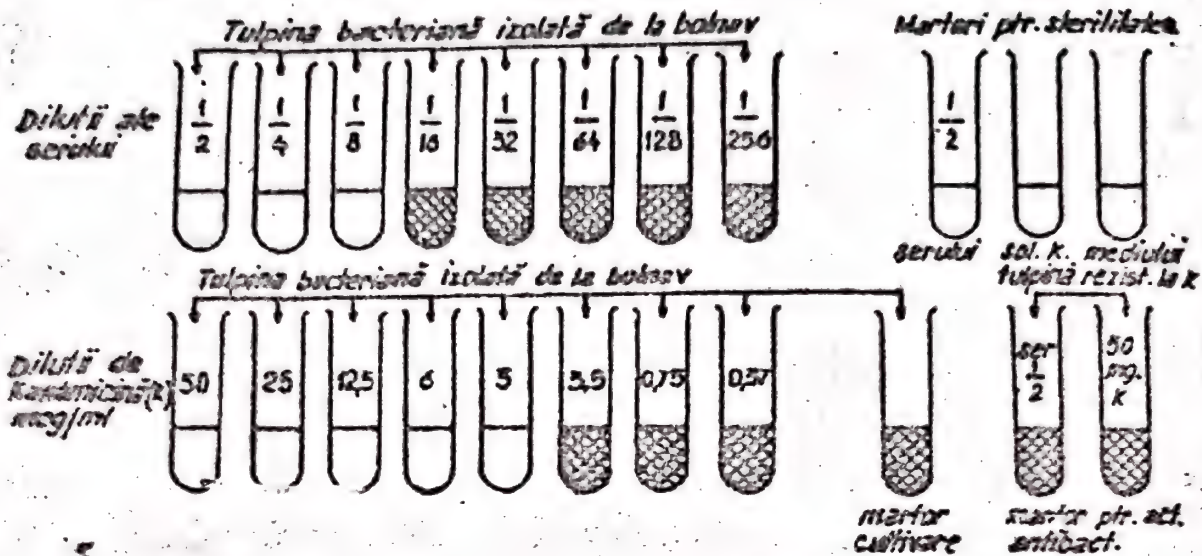


Fig.43 Schema determinării NEI concomitent cu dozarea kanamicinei în serul sanguin

Si acum să examinăm următoarele relații - variabile numai pentru determinările efectuate cu tulpina infectantă.

$$(1) \text{ NEI} = \frac{C}{\text{CMI}} ; \quad (2) C = \text{CMI} \times \text{inversul diluției de ser în care s-a realizat}$$

$$\text{Deci (2) NEI} = \frac{\text{CMI} \times \text{inversul diluției}}{\text{CMI}} = \text{inversul diluției}$$

decî, în exemplul nostru,  $\text{NEI} = 8$ .

Dacă în diluțiile de ser fără creștere evidentă se face numărătoarea germenilor viabili, se poate determina și nivelul de eficiență bactericidă. (NEB) a serului (diluția maximă de ser care distruge bacteriile din inoculum în proporție de 99,9-100%)



Cu alte cuvinte, pentru determinarea NEI și NEB în practica de rutină se poate opera numai șirul de tuburi cu diluții ale serului de testă însămânțate cu tulpina infectantă.

Dacă nu dispunem de tulpina infectantă putem face numai determinarea concentrației de antibiotic activ în ser utilizând în acest scop o tulpină de referință.

Cercetarea antibioticelor prin metoda diluțiilor în tub (cu specificațiile de mai sus) este aplicabilă pentru oricare altă din umorile normale sterile ale organismului (lcr, exsudate din cavitățile seroaselor ș.a.). Pentru determinări în umorile normale contaminate (urina recoltată în, cursul miștării spontane, spută ș.a.) sînt indicate metode difuzimetrice.

(2) Cercetarea antibioticelor în lcr se face în cursul antibioterapiei bolnavilor cu meningite purulente sau cu meningită tuberculoasă.

(3) Cercetarea antibioticelor în urină se face la bolnavii cu infecții urinare

- prezentînd deficiențe funcționale renale;
- după administrarea unui antibiotic nou sau pe o cale nouă.



## PARTEA A CINCEA

### IDENTIFICAREA PRINCIPALELOR BACTERII IMPLICATE IN PATOLOGIA INFECTIOASA

Nu încercați să rețineți datele prezentate în tabele. În practica identificării bacteriilor, reacțiile metabolice sînt selectate și interpretate cu tabelele în față.



## 10 IDENTIFICAREA COCILOR GRAM-POZITIV AȘEZATI IN GRĂMEZI

Staphylococcus

Micrococcus

Peptococcus

Dintre cocii gram-pozitiv așezați în grămezi îi reținem, cu interes pentru patologia infecțioasă, pe cei aerobi reuniți în genurile Staphylococcus și Micrococcus (familia Micrococcaceae) și pe cei anaerobi reuniți în genul Peptococcus (familia Peptococcaceae).

Stafilelococii sînt cei care se izolează cel mai frecvent din infecții.

### Genul Staphylococcus

Saprofii oportuniști, găzduiți normal pe tegumente și mucoase, stafilelococii contaminatează frecvent produse patologice ca exsudatul faringian, sputa, materiile fecale, urina. S.epidermidis contaminatează uneori și hemoculturile.

S.aureus îl urmărim și trebuie să-l identificăm în produse patologice ale infecțiilor pe care le determină: puroiul supurațiilor cu variate localizări



(plăgi traumatice și post-operatorii, piodermite, abcese, osteomielite), sînge (hemoculturi) în septicemii, lcr în meningite, sputa în pneumonii, urina în infecțiile căilor urinare, materiile fecale în enterocolitele post-antibiotice, materiile fecale, vărsături și alimente în toxinfecțiile alimentare.

S.epidermidis, bacterie cu potențial foarte redus de patogenitate, determină infecții numai atunci cînd capătă acces și se grefează în zone ale organismului cu apărare antiinfecțioasă precară (depozite de fibrină de pe valvulele cardiace, căile urinare în cursul uropatiilor obstructive ș.a.) Este izolat în mod repetat în hemoculturi practicate la bolnavi cu endocardite după cateterisme vasculare și intervenții chirurgicale pe cord, la bolnavi cu shunt ventriculo-venos pentru controlul hidrocefaliei, din urină în infecții ale căilor urinare.

În spitale se cercetează prezența tulpinilor epidemigene de S.aureus în exsudatul nasal și faringian la personal, în diferite probe de mediu (aer, suprafețe ș.a.) și în produse patologice de la bolnavi.

Rezervorul natural al S.aureus este mucoasa nazală.

Frotiul Gram din produse patologice evidențiază coci sferici gram-pozitiv așezați în perechi și, ca-



racteristic, în grămezi neregulate. Cocii morți nu rețin colorantul violet și apar gram variabil, cei gram-negativ putând fi confundați cu Neisseria. Sînt dispuși intra sau extracelular (fig.44).



Fig.44 Stafilococi. Frotiu: A - din produs patologic, B - din cultură (schematic)

Morfo-tinctorial, între stafilococi nu pot fi făcute diferențieri.

Cultura se dezvoltă după 18-24 ore de incubare aerobă sau anaerobă la  $37^{\circ}\text{C}$ , chiar și pe medii de bază - bulion și geloză nutritivă.

Pe geloză sînge, după incubare aerobă peste noapte, dezvoltă colonii rotunde cu diametrul de 1-2 mm, bombate, lucioase, opace.

Pigmentogeneza este variabilă și la culturile tinere discretă; se accentuează dacă cultura este lăsată pe masa de lucru pînă a doua zi.



Tulpinile care elaborează hemolizine formează colonii  $\beta$ -hemolitice (colonii înconjurate ou o zonă largă de hemoliză clară, completă).

Majoritatea tulpinilor de S.aureus formează colonii -hemolitice pigmentate frecvent în galben-auriu.

S.epidermidis formează colonii albe nehemolitice.

Sinteza echipamentului de patogenitate al S.aureus (antigene de suprafață, hemolizine, hialuronidază, dezoxiribonuclează, coagulază, fibrinolizină, enterotoxină ș.a.) prezintă largi variații care se reflectă direct în potențialul de patogenitate al diferitelor tulpini. Cel mai constant asociată cu patogenitatea S.aureus este coagulaza. S.epidermidis este coagulazo-negativ.

Evidențierea coagulazei prin testul în tub: 0,5 ml plasmă citratată de iepure (2 ml sol.5% citrat de Na + 8 ml sînge) diluată 1/4 cu ser fiziologic într-un tub de 10x100 mm este bogat însemîntată cu o ansă din cultura de 24 ore pe geloza a tulpinii de testat. Tubul este lasat pe baie de apă la 37°C. Se urmărește coagularea plasmei în intervalul de 1-4 ore.

Pentru identificarea tulpinilor producătoare de enterotoxină singurul test accesibil rămîne inocularea intra-peritoneală a 1-3 ml din filtratul toxic (aliment, vărsături, cultură) la pisoi de 6-8 săptămă-



mini.

Tiparea fagică, aplicabilă numai la tulpinile coagulazo-pozitive, este utilă pentru identificarea tulpinilor epidemigene, de spital ale S. aureus. Nu are valoare diagnostică la bolnav. Tulpinile izolate dintr-o izbucnire epidemică de spital aparțin aceluiași tip fagic.

Antibiograma. Stafilococii sînt natural sensibili la toate antibioticele active asupra bacteriilor gram-pozitiv. Dar tulpinile de stafilococ dobîndesc surprinzător de repede rezistență la antibiotice, atît la cele cu largă utilizare cît și la cele nou introduse în uz. De aceea, antibiograma se impune pentru toate tulpinile de stafilococ izolate de la bolnav și demonstrate a fi tulpini infectante.

#### In concluzie

Identificarea stafilococilor se face pe baza caracterelor morfo-tinctoriale și de cultură  
Cercetarea coagulazei este cel mai important test de rutină pentru aprecierea potențialului de patogenitate al unei tulpini de stafilococ. Antibiograma este indispensabilă pentru antibioterapia infecțiilor stafilococice.





Specii de Micrococcus sînt rar implicate în infecții. Totuși, ca saprofiți frecvenți pe tegumente, pot contamina unele produse patologice.

Morfo-tinctorial se diferențiază greu de stafilococi deși sînt coci cu diametrul în general mai mare. Se individualizează prin testul de oxidare-fermentare: micrococii oxidează glucoza în timp ce stafilococii o fermentează.

Peptococii sau stafilococii anaerobi, saprofiți oportuniști ai căilor respiratorii superioare și ai căilor genitale, sînt uneori izolați din infecții - de obicei mixte - genitale, pulmonare și alte supurații. Morfologic nu se deosebesc de stafilococi dar sînt obligat anaerobi.

./.



## 11 IDENTIFICAREA COCILOR GRAM-POZITIV AȘEZATI IN LANTURI

Streptococcus pyogenes

Streptococi piogeni animalii

Streptococcus pneumoniae

Enterococi

Streptococi viridans

Cocii gram-pozitivi așezați în lanțuri sînt reușiți în familia Streptococcaceae, care cuprinde streptococii aerobi facultativ anaerobi, și în genul Peptostreptococcus (al familiei Peptococcaceae), care cuprinde streptococii anaerobi.

Majoritatea streptococilor sînt saprofiți nepatogeni sau comensali oportuniști. Cîteva specii sînt patogene pentru om și animale (tabelul 3).

### Streptococii piogeni

Streptococii piogeni sînt bacterii patogene. Cei care determină în mod natural infecții ale omului sînt reușiți în specia Streptococcus pyogenes. Speciile patogene pentru animale, numite uzual streptococi piogeni animalii, pot determina accidental infecții ale omului.

S.pyogenes îl urmărim și trebuie să-l identificăm în produsele patologice ale infecțiilor pe



care le determină: exsudatul faringian în angine și scarlatine, puroi și exsudate în infecții epidemice ale plăgilor, piodermite, celulite, flegmoane ș.a., lohi în infecțiile puerperale, sînge (hemoculturi) în septicemii ș.a.

În scop epidemiologic, S.pyogenes se cercetează în exsudatul faringian și nazal pentru depistarea purtătorilor sănătoși din colectivități.

### Streptococcus pneumoniae

Pneumococii nevirulenți (forma R) sînt frecvent găzduiți la nivelul mucoaselor bucală și faringiană normale. Prezența și numărul lor suferă variații sezoniere și anuale. Contaminează normal probele de exsudat faringian și de spută.

Tulpinile virulente de pneumococ sînt urmărite și trebuie identificate în produsele patologice ale infecțiilor pe care le determină: sputa în pneumonii, lor în meningite, puroiul în otite, mastoidite, peritonite, ocazional plăgi, infecții oculare. Se urmărește, de asemenea, în hemoculturile practicate pentru depistarea bacteriemiei care însoțesc pneumoniile și alte infecții localizate.

### Streptococci comensali oportuniști

Enterococci habitează intestinul omului și al animalelor. Apar în calitate de contaminanți nor-



Tabelul 3.

Tipul de hemoliză, habitatul și patogenitatea pentru om a streptococilor

Grupări fiziologice	Grupul serologic	Specia	Tipul hemolitic	Habitat	Patogenitatea pentru om
<u>Streptococcus</u>					
Streptococii piogeni	A	S.pyogenes	$\beta$	om	Numeroase infecții la om
	B	S.galactiae	$\alpha/\beta$	bovidee	Izolați uneori
	C	Diferite specii	$\alpha/\beta$	bovidee, cabaline, ovine s.a.	și din infecții umane
		Tulpini umane		$\beta$	om
	E		$\beta$	bovidee	Izolat uneori din inf. umane
	F	S.anginosus	$\beta$	om	Posibilă (inf. respiratorii)
	G		$\beta$	om	Infecții la om uneori grave
	H	S.sanguis	$\alpha$	om	Posibilă (inf. respiratorii, endocardite)
Pneumococi		S.pneumoniae	$\alpha$	cavitatea buco-faringiană la om și animale	Comensal, oportunist (inf. respiratorii, otite, meningite peritonite s.a.)
Enterococi	D	Diferite specii	$\alpha/\beta/-$	intestinul omului și animalelor	Comensali, oportuniști (inf.urinare, endocardite subacute)
Streptococi viridans		Diferite specii	$\alpha$	cavitatea buco-faringiană la om și animale	Comensali, accidental patogeni (endocardite subacute)
Streptococi lactici	N	S.lactis	-	lapte și produse lactate	Nepatogeni
		S.cremoris	-		
<u>Peptostreptococcus</u>					
Streptococi anaerobi		Diferite specii	-	mucosa genitală	Comensali, oportuniști (febră puerperală, endocardite, inf.mixte plăgi)





malii ai materiilor fecale, urinii din micțiunea spontană. În afara oricărei condiții patologice, pot fi prezenți, ocazional, în exsudatul faringian.

Îi urmărim și trebuie să-i identificăm în produsele patologice ale infecțiilor pe care pot să le determine: sînge (hemoculturi) în endocarditele subacute, urina în infecțiile căilor urinare, exsudate din infecțiile genitale.

Streptococii viridans sînt cei mai constanți și numeroși comensali ai cavității bucale și faringiene normale. În mod accidental, la bolnavi cu leziuni valvulare cardiace determină endocardite subacute putînd fi evidențiați prin hemoculturi.

Streptococii anaerobi habitează natural mucoasa căilor genitale fiind găsiți în mod normal în secrețiile vaginale. Au fost izolați din lohii în infecții uterine post-partum, din puroiul unor supurații pleuro-pulmonare, abcese cerebrale, hepatice, plăgi profunde supurate, din sînge (hemoculturi) de la bolnavi cu endocardită subacută.

Frotiul Gram din produse patologice evidențiază ooci gram-pozitivi așezați în lanțuri de lungime variată sau în perechi. Cocii sînt sferici sau eliptici cu axul lung în prelungire. (fig.45).

Pneumococii virulenți, în produsele patologice din infecțiile pe care le determină, apar caracteristic ca diplococi lanceolați, gram-pozitivi,



capsulați (fig.46 A).

Exceptând pneumococii virulenți, morfotinctorial, între speciile de streptococi nu pot fi făcute diferențieri, indiferent de caracterul lor - saprofit, comensal sau patogen, aerob sau anaerob.

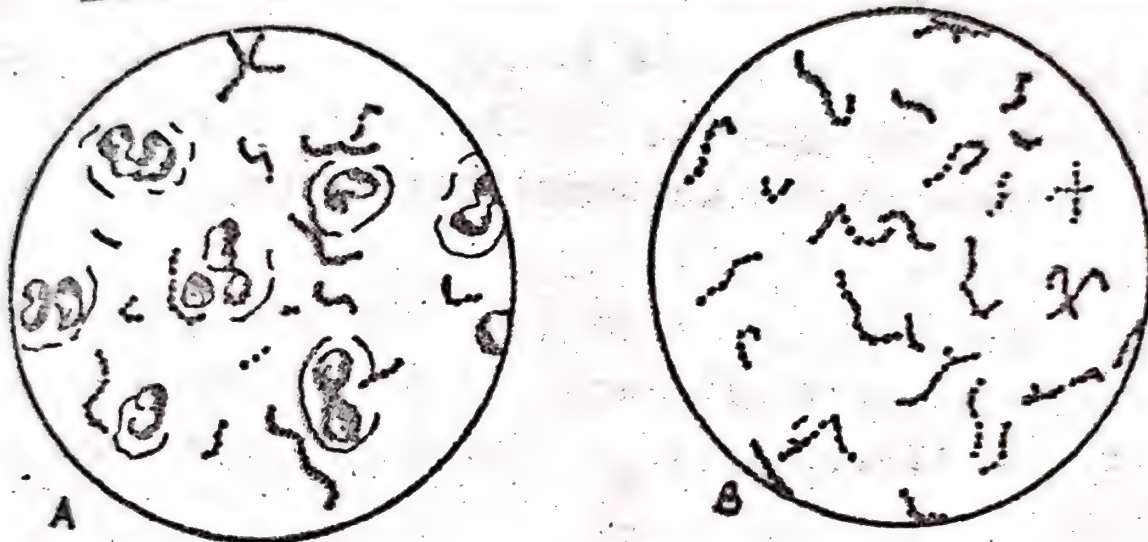


Fig.45 Streptococi. Frotiu: A - din produs patologic, B - din cultură (schematic)

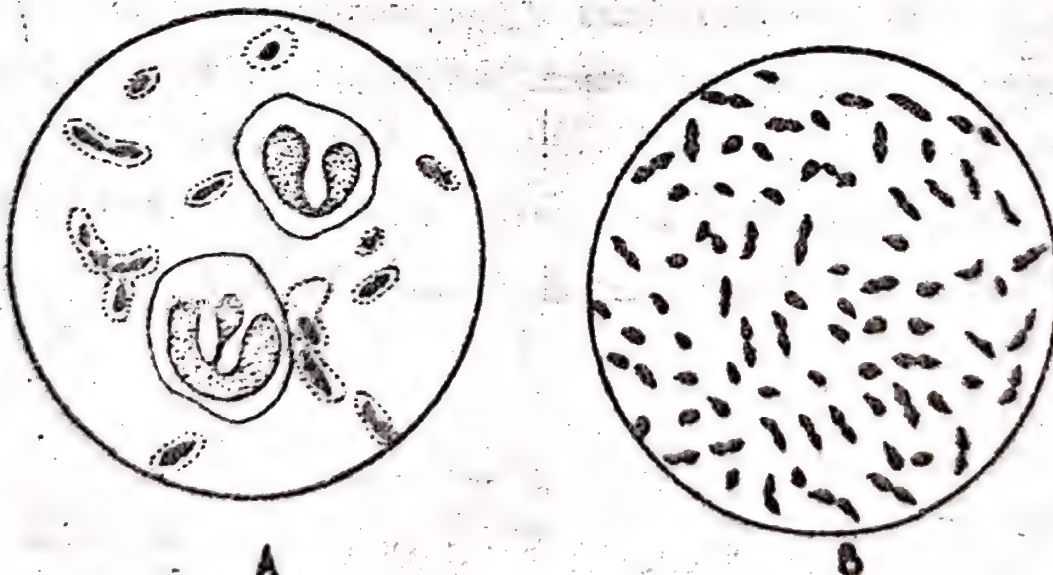


Fig.46 Pneumococul. Frotiu: A - din produs patologic, B - din cultură (schematic)



Cultivați *in vitro* pierd capsula și tind să se dispună în lanțuri.

Morfotipic, între pneumococii nevirulenți și streptococii comensali, care contaminatează și ei normal probele de spută ș.a. nu pot fi făcute diferențieri.

Cultura se dezvoltă după 18-24 ore de incubare la 37°C. Majoritatea speciilor necesită medii îmbogățite în factori nutritivi.

(i) Pe geloză sânge după incubare aerobă dezvoltă colonii mici de 0,1-1 mm diametru cu aspect variabil după specie și tulpină.

- Coloniile  $\beta$ -hemolitice sînt înconjurate cu o zonă largă de hemoliză completă, clară. Colonii  $\beta$ -hemolitice formează majoritatea tulpinilor de S. pyogenes, unii streptococi piogeni animalii, unii enterococi și, rar, unii pneumococi.

- Coloniile  $\alpha$ -hemolitice sînt înconjurate cu un halou verzui în care hematiile rămîn intacte. Colonii  $\alpha$ -hemolitice formează streptococi viridans, pneumococi, unii enterococi și streptococi piogeni animalii.

- Colonii nehemolitice - streptococi nehemolitici.

\*) Tulpinile de S. pyogenes care nu elaborează streptolizina S (întîlnite relativ rar) formează după incubarea aerobă colonii  $\alpha$ -hemolitice sau cu hemoliză parțială.



Pneumococii formează colonii mai transparente decât streptococii viridans sau enterococii. Tulpinile capsulate, virulente formează colonii mucoide. Tulpinile necapsulate, avirulente formează colonii S sau R. După 36-90 ore cultura de pneumococ se autolizează determinînd apariția unei depresiuni în centrul coloniei. Subliniem că aspectul culturii nu permite decât o diferențiere prezumptivă a pneumococilor de streptococii viridans sau enterococi.

O mică parte din tulpinile de S. pyogenes și pneumococ necesită la izolarea din organism incubarea în atmosferă cu 5-10% CO<sub>2</sub> (vezi capitolul 3, p.60).

(ii) Pe geloză sînge după incubare anaerobă se dezvoltă toți streptococii formînd colonii puțin mai mari decât după incubarea aerobă iar zonele de  $\beta$ -hemoliză\*) sînt mai largi. După incubarea anaerobă pneumococii formează colonii  $\beta$ -hemolitice.

Streptococii obligat anaerobi dezvoltă după 48-72 ore de incubare la 37°C colonii mici nehemolitice.

---

\*) Tulpinile de S. pyogenes care în incubarea aerobă formau colonii  $\alpha$ -hemolitice sau cu hemoliză parțială formează după incubarea anaerobă colonii  $\beta$ -hemolitice (activarea streptolizinei O).



### Identificarea antigenică a streptococilor $\beta$ -hemolitici

Pe baza unui antigen somatic de grup, polizaharidul C, streptococii sînt împărțiți în grupe serologice denumite cu literele majuscule ale alfabetului de la A la O (exceptînd I și J). În afara streptococilor  $\beta$ -hemolitici în gruparea serologică sînt cuprinși și unii dintre streptococii  $\alpha$ -hemolitici posesori ai polizaharidului C (streptococii piogeni animalii, enterococii din care unii sînt  $\alpha$ -hemolitici iar alții  $\beta$ -hemolitici - a se vedea tabelul 3).

Streptococcus pyogenes este streptococ  
 $\beta$ -hemolitic grup A.

Streptococii piogeni animalii, care determină accidental infecții la om, aparțin grupelor B, C, E ș.a. (tabelul 3).

Dintre infecțiile umane cu streptococi  $\beta$ -hemolitici pe primul loc ca frecvență și gravitate a complicațiilor se situează cele cu streptococi  $\beta$ -hemolitici grup A. De aceea, odată stabilită prezența streptococului  $\beta$ -hemolitic într-un produs patologic se impune identificarea grupului antigenic - demonstrarea apartenenței la grupul A.

Identificarea grupului antigenic al streptococilor se face prin reacția de precipitare inelară folosind seruri specifice de grup și un extract an-



tigenic din cultura tulpinii de identificat (vezi capitolul 6, p.87).

O identificare prezumtivă a streptococilor grup A se poate efectua mai economic prin testul de sensibilitate la bacitracină.

Testul de sensibilitate la bacitracină pentru identificarea economică și prezumtivă a streptococilor din grupul A.

Tulpina de identificat se însămânțează în striuri paralele, dense pe un sector al unei plăci cu geloză sânge. În mijlocul ariei însămânțate se depune un microcomprimat conținând 0,5 u bacitracină. În continuare, plăcile sînt incubate peste noapte la 37°C.

Tulpinile bacitracin sensibile (diametrul zonei de inhibiție mai mare de 10 mm) sînt raportate aparținînd grupului A.

Streptococii grup A sînt sensibili la bacitracină în proporție de 98,3% în timp ce restul streptococilor  $\beta$ -hemolitici sînt rezistenți în proporție de 97,5%

Identificarea pneumococilor. Diferențierea de alți streptococi  $\alpha$ -hemolitici.

Caracterele morfo-tinctoriale ca și cele ale culturii sînt numai prezumtive pentru identificarea pneumococilor. Teste de certitudine utilizate curent pentru această identificare sînt<sup>\*)</sup> :

(i) virulența pentru șoarece, (ii) sensibilitatea

<sup>\*)</sup> Reacția de umflare a capsulei, cel mai specific test de identificare a pneumococilor, necesită seruri față de toate cele 87 de tipuri antigenice ale pneumococilor. De aceea, nu poate fi un test pentru identificarea de rutină a pneumococilor.



la optochin, (iii) solubilitatea în bilă și (iv) fermentarea inulinei.

(i) Virulența pentru soarece

Spre deosebire de enterococi și streptococi viridans, pneumococii capsulați sînt virulenți pentru șoarece.

Inoculați la șoarece intra-peritoneal (produse patologice normal sterile și culturi pure) sau subcutanat (sputa și alte produse normal contaminate) pneumococii determină o infecție septicemică mortală în 24-48 ore. La necropsie, pneumococii pot fi izolați în hemocultură iar examenul microscopic îi evidențiază pe frotiurile din splină, ficat și sînge.

(ii) Sensibilitatea la optochin. Testul este aplicabil și pe cultură primară.

Tulpina de identificat se însămînțează dens, în striuri paralele, pe un sector al unei plăci cu geloză sînge. În centrul ariei însămînțate se depune o rondelă de hîrtie de filtru de 5 mm diametru impregnată cu 0,02 ml dintr-o soluție 1/5000 optochin. Se incubează peste noapte la 37°C. Pneumococii prezintă o zonă de inhibiție cu diametrul de minimum 15 mm.

Testul permite identificarea a peste 90% din tulpinile de pneumococi.

(iii) Solubilitatea în bilă. Agenții tensioac-



tivi, cum sînt bila, sărurile biliare, ac ioneaz  asupra peretelui celular al pneumococilor  i determină liza acestora, tradusă prin clarificarea suspensiei bacteriene. Testul este pozitiv numai cu cultura vie a pneumococilor virulenți (capsulați).

Cultura de 18 ore a tulpinii de testat în bulion  u 5% ser de cal este centrifugată  i apoi resuspensionat  în ser fiziologic. Se controlează pH-ul. Dacă este acid se neutralizează - pH-ul acid poate inhiba reac ia de biloliz . Suspensia astfel obținută este  mp r it  în 2 tuburi de aglutinare sterile. Intr-unul din tuburi  e adaugă 4 picături din soluția 10% dezoxicolat de sodiu.  n celălalt tub, martorul, se adaugă un număr egal de picături de ser fiziologic. Ambele tuburi se incubează la baia de apă la 37 C. Se face o citire după 10 min.  i alta după 1 or . Testul este pozitiv dacă în acest interval suspensia din tubul la care s-a adăugat sarea biliară se clarifică iar martorul r m ne opalescent.

(iv) Fermentarea inulinei se studiază pe mediul Hiss cu ser. Inulina este fermentată de majoritatea tulpinilor de pneumococ.).

De la toate aceste teste există excep ii privind at t comportarea pneumococilor c t  i a streptococilor  -hemolitici. De aceea, pentru identificarea pneumococilor nu se recurge numai la un singur test ci se coroborează rezultatele a 2 sau mai multe teste.

.) Unele tulpini de streptococi  -hemolitici (S. sanguis  i S. salivarius) fermentez  de asemenea inulina.



### Identificarea streptococilor $\alpha$ -hemolitici

Enterococii  $\alpha$ -hemolitici se diferențiază de streptococii viridans prin

- (i) apartenența lor la grupul serologic D;
- (ii) capacitatea de a cultiva pe medii cu 40% bilă și de a fermenta esculina (testul esculină-bilă pozitiv pentru enterococi);
- (iii) supraviețuirea după încălzirea 30 min. la 60°C (testul de rezistență termică pozitiv pentru enterococi).

Testul esculină-bilă. Tulpina de identificat se în-sămânțează pe o placă cu geloză-sînge cu 40% bilă, esculină și citrat de fier ca indicator. Apariția de colonii negre, cu halou negru indică o reacție pozitivă.

Testul de rezistență termică. Pe 2 sectoare ale unei plăci cu geloză sînge se repică cultura în bulion ser a tulpinii de identificat înainte și după încălzirea 30 min. la 60°C pe baia de apă. Se incubează peste noapte la 37°C. Apariția culturii în cele 2 sectoare indică rezistența termică a tulpinii testate. Apariția culturii exclusiv în sectorul în care s-a repicat cultura înainte de încălzire indică sensibilitatea termică a tulpinii.

Alte teste biochimice permit identificarea speciilor de enterococi și streptococi viridans. Cei interesați în acest sens pot consulta cu folos bibliografia indicată.

### Antibiograma

Streptococii sînt natural sensibili la toate



antibioticele active asupra bacteriilor gram-pozitive.

Streptococcus pyogenes, pneumococii și streptococii anaerobi și-au păstrat sensibilitatea naturală la penicilină.

Pentru administrarea penicilinei, antibioticul de elecție, în infecțiile cu Streptococcus pyogenes și pneumococi antibiograma nu este necesară. În septicemii rămâne însă necesară determinarea CMI a penicilinei față de tulpina infectantă.

Sensibilitatea reală la antibiotice a tulpinilor de streptococi viridans și de enterococi este variată datorită rezistenței dobândite. De aceea, antibiograma se impune pentru toate tulpinile de streptococ viridans și enterococ izolate de la bolnav și demonstrate a fi tulpini infectante. Pentru antibioterapia acestor infecții antibiograma trebuie să controleze și efectul asociației penicilină + streptomycină care se demonstrează frecvent sinergică.

#### In concluzie

Streptococcus pyogenes este identificat pe baza caracterelor morfo-tinctoriale, ale culturii pe geloză-sînge și apartenenței la grupul serologic A. Antibiograma nu este necesară pentru terapia cu penicilină a infecțiilor cu S. pyogenes.



Identificarea enterococilor se face pe baza caracterelor morfo-tinctoriale, de cultură pe geloză-sînge, apartenenței la grupul serologic D și a caracterelor biochimice. Antibiotograma este indispensabilă pentru terapia infecțiilor cu enterococi.

Identificarea streptococilor viridans se face pe baza caracterelor morfo-tinctoriale, de cultură pe geloză-sînge și biochimice. Antibiotograma este indispensabilă pentru terapia infecției cu streptococi viridans.

Identificarea pneumococilor se face pe baza caracterelor morfo-tinctoriale, de cultură pe geloză-sînge, virulenței pentru soarece, sensibilității la optochin, solubilității în bilă, fermentării inulinei. Antibiotograma este necesară numai pentru infecțiile septice-mice cînd se fac determinări cantitative.

Identificarea streptococilor anaerobi se face pe baza caracterelor morfo-tinctoriale și de cultură.



## 12 IDENTIFICAREA COCILOR GRAM-NEGATIVI

Neisseria gonorrhoeae

Neisseria meningitidis

Neisserii „nepretențioase”

Branchamella catarrhalis

Veillonella

Cocii gram-negativi aerobi sînt reușiți în genurile Neisseria și Branchamella ale familiei Neisseriaceae.

Cocii gram-negativi anaerobi sînt reușiți în familia Veillonellaceae.

Neisseria gonorrhoeae o urmărim și trebuie să o identificăm în produsele patologice ale infecțiilor pe care le determină: puroiul uretral în uretritele acute purulente ale bărbatului, exsudatul de la nivelul colului uterin în cervicite la femei (infecții adesea asimptomatice), exsudatul conjunctival în oftalmia noului născut, exsudatul vulvo-vaginal în vulvo-vaginitele fetițelor; în exsudatele articulare, hemoculturi, lcr ș.a. în cursul complicațiilor infecției gonococice.

Omul este singura gazdă pentru N.gonorrhoeae.



Neisseria meningitidis o urmărim și trebuie să o identificăm în produsele patologice ale infecțiilor pe care le determină: în lor și în hemoculturile de la bolnavii cu meningită purulentă. Ocazional determină infecții respiratorii și a fost evidențiată în spută.

N.meningitidis este prezentă și în nazo-faringe la purători sănătoși.

Omul este singura gazdă pentru N.meningitidis.

Neisseriile comensale și Branchamella catarrhalis sînt normal prezente pe mucoasa bucală, faringiană, genito-urinară și în intestinul omului și animalelor. De aceea, apar ca contaminanți normali ai probelor de exsudat faringian, spută, exsudate genitale ș.a.

Ocazional, au fost izolate din spută, aspirate traheale și pulmoni în infecții respiratorii, din lor în unele meningite.

Speciile de Veillonellaceae, în calitate de comensale ale mucoaselor respiratorii superioară, intestinală și genito-urinară, pot contamina normal probele de exsudat faringian, spută, exsudate genitale.

Protiul Gram din produse patologice evidențiază diplococi gram-negativi, ovalari, cu axul lung paralel (diplococi „în boabe de cafea”). Majorita-





tea sînt dispuși intracelular (fig.47 a,b).

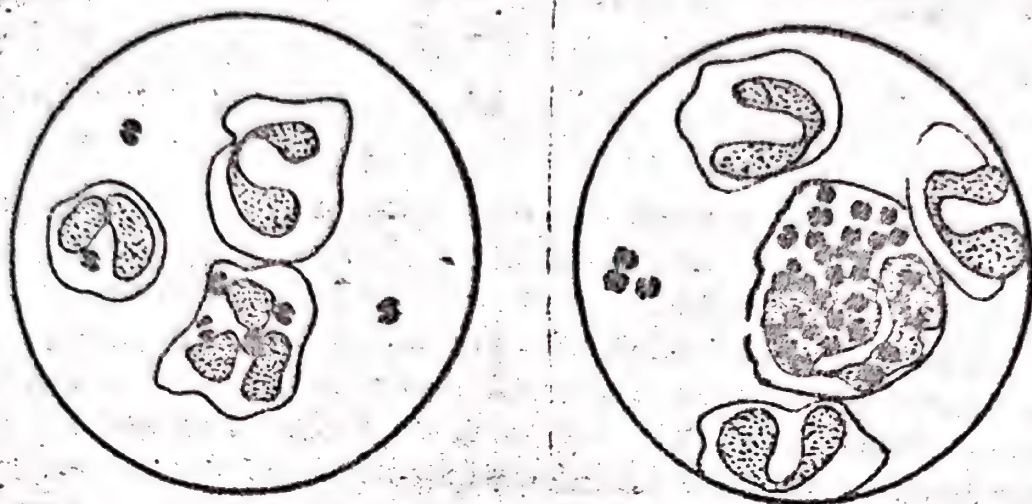


Fig.47 a - Meningococ: frotiu din lcr;  
b - gonococ: frotiu din puroi uretral  
(schematic)

Cracteristic pentru infecția gonococică acută este numărul mare de diplococi prezenți în citoplăsma polinuolearelor și macrofagelor (celule „burate” cu diplococi). În infecțiile gonococice cronice această așezare caracteristică dispare iar cocii, rari pe frotiu, prezintă o morfologie eberantă (coci sferici, giganti, inegali ca mărime ș.a.).

### Cultura

(i) Pe geloză-sînge la 37°C în aerobioză și atmosferă umedă cu 5-10% CO<sub>2</sub>) (alte medii îmbogățite recomandate pentru cultivarea neisseriilor patogene: mediul Mueller-Hinton, geloză chocolate cu extract de levură etc.).

Meningococul și gonococul formează, după 24 ore



tea sînt dispuși intracelular (fig.47 a,b).

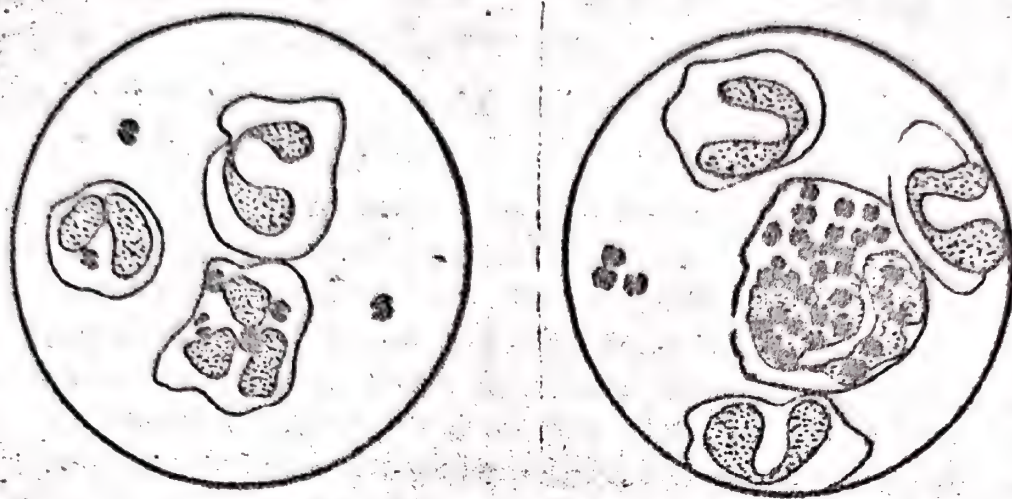


Fig.47 a - Meningococ: frotiu din lcr;  
b - gonococ: frotiu din puroi uretral  
(schematic)

Caracteristic pentru infecția gonococică acută este numărul mare de diplococi prezenți în citoplasma polinuclearelor și macrofagelor (celule „burate” cu diplococi). În infecțiile gonococice cronice această așezare caracteristică dispare iar cocci, rari pe frotiu, prezintă o morfologie aberantă (cocci sferici, giganti, inegali ca mărime ș.a.).

### Cultura

(i) Pe geloză-sînge la  $37^{\circ}\text{C}$  în aerobioză și atmosferă umedă cu 5-10%  $\text{CO}_2$  (alte medii îmbogățite recomandate pentru cultivarea neisseriilor patogene: mediul Mueller-Hinton, geloză chocolat cu extract de levură etc.).

Meningococul și gonococul formează, după 24 ore





de incubare, colonii S de 1-2 mm diametru, rotunde sau lobate, lucioase, cenușii sau incolore, nehemolitice.

Dacă cultura nu se dezvoltă după 24 ore, plăcile se reîncubează în continuare pînă la 48 ore.

Bacterii fragile, sensibile la rece, meningococul și gonococul sînt greu de menținut în cultură. După examinarea culturii plăcile se reintroduc în termostaț.

Neisseriile comensale formează colonii cu aspecte variate: rotunde, lucioase, cenușii sau incolore; rotunde sau lobate și cu suprafața uscată, granulată sau cutată, cenușii sau pigmentate în galben sau galben verzui, consistente, greu emulsionabile.

Spre deosebire de meningococ și gonococ, neisseriile comensale sînt „nepretentioase”: cultivă și la 22°C pe medii simple (tabelul 4).

(ii) Pe geloză sînge în anaerobioză la 37°C se dezvoltă Veillonelaceae-le. Multe tulpini de Neisseria sînt strict aerobe și nu se dezvoltă, iar cele facultativ anaerobe formează colonii foarte mici.

Frotiul Gram din cultură evidențiază coci gram-negativi, sferici sau în boabă de cafea, inegali ca mărime, așezați izolat, în perechi și, cel mai frecvent, în grămezi mari. Frotiul din cultura neisseriilor patogene evidențiază frecvent coci dezintegrați ca urmare a autolizei.



În culturi mixte reperarea coloniilor de Neisseria se face ușor prin reacția oxidazei. Neisseriile produc indofenoloxidază, enzimă capabilă de a oxida un colorant redox care își schimbă culoarea.

Pe coloniile suspecte se depune câte o ansă din soluția 1% de para-aminodimetilanilină monohidroclică proaspăt preparată. Coloniile care produc indofenoloxidază devin roze, iar în interval de 5-10 min. culoarea evoluează progresiv la maro, roșu închis, negru. În acest ultim stadiu bacteriile sînt moarte dar își păstrează caracterele morfo-tinctoriale și colorabilitatea prin anticorpi fluorescenți. Repicarea coloniei trebuie făcută în stadiul de culoare roz.

Diferențierea gonococului de meningococ se face pe baza următoarelor teste:

(i) Spectrul de fermentare a zaharurilor (vezi tabelul 4).

(ii) Colorarea directă cu anticorpi fluorescenți este o metodă rapidă de identificare a meningococului și gonococului pe frotiurile din produse patologice sau din culturile tinere în care mai persistă antigenele de suprafață (singurele specifice).

Antibiograma. Neisseriile sînt natural sensibile la antibioticele cu spectrul penicilinelor de biosinteză și la antibioticele cu spectru larg. Penicilina rămîne antibioticul de elecție în tratamentul infecțiilor meningococice și gonococice.



- 158 -

Tabelul 4

Caractere diferențiale ale speciilor de Neisseria și Branhamella

Specia	Cultivarea pe		Reacții fermentative					
	geloză	geloză-	glu-	mal-	zaha-	lac-	fruc-	ma-
	-sînge	nutritivă	coză	toză	roză	toză	toză	nită
la 22°C								
N.meningitidis	+	-	+	+	-	-	-	-
N.gonorrhoeae	+	-	+	-	-	-	-	-
N.lactamica	+	-	+	+	-	(+)	-	-
N.sicca	+	+	+	+	+	-	+	-
N.flava	+	+	+	+	-	-	+	-
N.perflava	+	+	+	+	+	-	+	+
N.subflava	+	+	+	+	-	-	-	-
N.flavescens	+	+	-	-	-	-	-	-
B.catarrhalis	+	+	-	-	-	-	-	-

Legenda: + = cultivare, respectiv fermentare  
- = lipsa culturii, respectiv fermentării  
( ) = reacție lentă



**In concluzie**

Neisseriile patogene, meningococul și gonococul, se diferențiază de neisseriile comensale pe baza caracterelor de cultură și a exigențelor nutritive.

Pentru diferențierea meningococului de gonococ se cercetează spectrul de fermentare al zaharurilor sau se recurge la colorația directă cu anticorpi fluorescenți.



13 IDENTIFICAREA BACILILOR INTESTINALI  
GRAM-NEGATIVI FACULTATIV ANAEROBI

Salmonella

Shigella

Escherichia

Klebsiella

Proteus

Yersinia

Vibrio cholerae

Bacilii intestinali.<sup>\*)</sup> gram-negativi facultativ anaerobi sînt reuiniți în familia Enterobacteriaceae și în genul Vibrio al familiei Vibrionaceae.

Salmonella, Shigella, Yersinia pestis și Vibrio cholerae sînt patogeni. Restul sînt saprofiți oportuniști care, de la nivelul intestinului, la pacienți cu deficiențe ale apărării antiinfecțioase, pot invada alte regiuni ale organismului determinînd infecții cu gravitate variată.

Mai frecvent izolate din infecții sînt genurile Salmonella, Shigella, Escherichia, Klebsiella, Proteus.

Frotiul Gram din produse patologice. Are valoare numai pentru produsele care provin din zone nor-

<sup>\*)</sup> Yersinia pestis este singura specie de Enterobacteriaceae care nu habitează intestinul.



mal sterile. Evidențiază bacili gram-negativi uneori capsulați.

Morfotipic, între Enterobacteriaceae nu pot fi făcute diferențieri.

Cultura pe medii uzuale nu aduce date suficiente pentru diferențierea enterobacteriaceelor. Pe geloză nutritivă sau geloză-sînge toate, exceptînd Proteus (vezi p. 173) și Yersinia (vezi p. 175) formează după 24 ore la 37°C colonii mari, S, rotunde, ușor convexe, cenușiu-translucide. Aceleași caractere le are și cultura pe medii ou bilă (pe aceste medii și Proteus formează colonii nedistincte de ale altor Enterobacteriaceae).

Tulpinile capsulate formează colonii mucoide.

### Izolarea Enterobacteriaceae-lor

(i) Din materiile fecale și alte produse normal contaminate

Salmonella și Shigella se izolează pe medii selective (agar-dezoxicolat-citrat, mediul SS ș.a.). Prezența acestor patogeni eventual în număr redus impune înăsămîntarea probelor și într-un mediu de îmbogățire cu repicarea pe un mediu selectiv după 24 ore de incubare la 37°C.

Enterobacteriaceae-le saprofite se izolează pe medii slab selective (mediu Mac Conkey ș.a.) sau,



mai bine, numai diferențiale (mediul Drigalski ș.a.)

Toate aceste medii, selective și diferențiale, conțin lactoză și diferențiază Enterobacteriaceae-le în lactozo-pozitive și lactozo-negative.

Enterobacteriaceae lactozo-pozitive:  
Escherichia, Klebsiella ș.a.

Enterobacteriaceae lactozo-negative: Shigella,  
Salmonella, Proteus, Yersinia ș.a.

#### (ii) Din produse normal sterile

Enterobacteriaceae-le se izolează pe geloză-sînge și bulion glucozat (în suspiciunea de febră enterică hemocultura se face în bulion-bilă). Inșămînțarea pe medii diferențiale lactozate este facultativă.

#### Triajul preliminar al izolațiilor

Permite orientarea rapidă și economică asupra identității probabile a izolațiilor. Aspectul este important pentru izolarea și identificarea shigel-lor și salmonellelor din probele de materii fecale: pe mediile de izolare coloniile lactozo-negative ale enterobacteriaceelor patogene nu pot fi deosebite de cele ale enterobacteriaceelor saprofite (Proteus ș.a.) pentru care identificarea completă nu este necesară.

Mediul Hajna este o geloză nutritivă care conține 2 zaharuri - glucoza și lactoza -, roșu fenol



ca indicator pentru fermentare și sulfat feros ca indicator pentru producerea de  $H_2S$ . Mediul se repartizează în tuburi în coloană și pantă. Mediul neînsămânțat are culoarea roșie ca cireașa. Însămânțarea se face, cu acul, prin înțepare în coloană și etalare pe pantă. După 18-24 ore la  $37^{\circ}C$  se face citirea tuburilor (tabelul 5).

### Tabelul 5

Citirea reacțiilor pe mediul Hajna

<u>Reacția</u>	<u>Explicația</u>
Coloana acidă (galbenă) Panta alcalină (roșie)	Fermentată numai glucoza.*)
Coloana și Panta acide (galbene)	Fermentate glucoza și lactoza
Coloana și Panta alcaline (roșii)	Cultură nefermentativă
Bule de gaz în coloană Înnegrire în coloană	Cultură aerogenă Producere de $H_2S$

\*) Pentru a permite detectarea culturilor care fermentează numai glucoza, în mediu raportul între glucoză și lactoză este 1:10. Astfel, fermentarea glucozei duce la apariția unor cantități reduse de acizi care sînt oxidați rapid în panta care rămîne alcalină.

Mediul pentru evidențierea ureazei: vezi capitoul 4, p.71.



Stabilirea identității probabile a izolațiilor în funcție de rezultatele reacțiilor pe mediile de triaj preliminar este prezentată în tabelul 6.

Identificarea Enterobacteriaceae-lor lactozo-  
pozitive

(i) Izolate din materii fecale. Dacă proba provine de la un adult, coloniile lactozo-pozitive sînt trecute cu vederea<sup>\*)</sup>: sînt saprofiți de contaminare normală.

În probele diareice de la copii sub 2 ani se urmărește prezența tulpinilor enteropatogene de Escherichia coli. Acestea sînt tulpini posesoare a fracțiunii antigenice B (tabelul 7). Biochimic nu pot fi diferențiate de restul tulpinilor. Se identifică numai antigenia.

Tabelul 7

Tipurile enteropatogene de Escherichia coli circulante în România

=====

Esch.coli	O	26	B <sub>6</sub>	
"	"	0	55	B <sub>5</sub>
"	"	0	86	B <sub>6</sub>
"	"	0	111	B <sub>4</sub>
"	"	0	119	B <sub>14</sub>

=====

=====

Esch.coli	O	124	B <sub>17</sub>	
"	"	0	125	B <sub>15</sub>
"	"	0	126	B <sub>16</sub>
"	"	0	127	B <sub>8</sub>
"	"	0	128	B <sub>12</sub>

=====

<sup>\*)</sup> Rarele excepții de la această regulă vor fi discutate în capitolul 32.



Tabelul 6

Identitatea probabilă a bacililor intestinali gram-negativi facultativ anaerobi în funcție de rezultatele triajului biochimic preliminar

Reacții pe mediu Hajna				Reacții pe mediu Christensen	
				Urează pozitiv	Urează negativ
				Identitatea probabilă	
Panta:	acid	lactoză	+	Klebsiella (lent)	
Coloana:	acid	glucoză	+	Enterobacter	
Coloana:	gaz sau	$H_2S$	-	Escherichia	Enterobacter
				Citrobacter $H_2S$	-
Panta:	acid	lactoză	+	Citrobacter $H_2S$ +	
Coloana:	acid	glucoză	+	Arizona	
Coloana:	gaz +	$H_2S$ +		(lactozo-pozitiv)	
Panta:	alcalin	lactoză	-	Salmonella	
Coloana:	acid	glucoză	+	Arizona	
Coloana:	gaz +	$H_2S$ +		Citrobacter	Proteus
				(Bethesda)	hauseri
				Edwardsiella	
Panta:	alcalin	lactoză	-	Proteus	
Coloana:	acid	glucoză	+	Escherichia	morganii
Coloana:	gaz +	$H_2S$ -		(lactozo -)	Proteus
					rettgeri
Panta:	alcalin	lactoză	-	Salmonella <sup>*)</sup>	
Coloana:	acid	glucoză	+	Shigella	
Coloana:	gaz -	$H_2S$ -		Escherichia	Proteus
				(lactozo -	rettgeri
				anaerogenă)	
				Providencia	
				Serratia	
Panta:	alcalin	lactoză	-	Pseudomonas	
Coloana:	alcalin	glucoză	-	sau alți bacili	
Coloana:	gaz -	$H_2S$ -		gram-negativi	
				nefermentativi	

<sup>\*)</sup> Salmonella typhi produce o cantitate mică de  $H_2S$  și numai rar gaz.



- Tiparea serologică. 5 colonii lactozo-pozitive de pe placa de izolare se testează în reacția de aglutinare pe lamă cu ser polivalent (vezi capitolul 6, p. 91). Dacă reacția este negativă se mai face o aglutinare cu cultura lactozo-pozitivă confluentă.

Coloniile care au aglutinat cu serul polivalent se repică pe mediul diferențial lactozat în vederea aglutinării pe lamă cu seruri monovalente. Rezultatele pozitive trebuie verificate prin aglutinare în tuburi (vezi capitolul 6, p. 93).

Dacă cu serul polivalent a aglutinat numai cultura confluentă, repicarea se face dintr-un flocon aglutinat din picătura de ser polivalent.

- Colorarea directă cu anticorpi fluorescenți a frotiului din proba de materii fecale.

(ii) Izolații din produse provenite din zone normal sterile (urină<sup>\*)</sup>, spută<sup>\*)</sup>, bilă<sup>\*)</sup>, sânge, lac ș.a.) sunt identificați biochimic<sup>\*\*)</sup>

<sup>\*)</sup> Izolații din aceste produse se identifică numai atunci când există certitudinea implicării lor în procesul infecțios (vezi capitolele 29, 31).

<sup>\*\*)</sup> Identificarea antigenică, exceptând cea a tulpinilor enteropatogene de Esch.coli, nu este încă posibilă în laboratoarele de rutină - rămâne de competența centrelor de referință; deși, pentru rațiunile expuse la p.169 identificarea tipului serologic al acestor bacterii (în primul rând Esch.coli) izolate repetat din infecții urinare ar aduce clinicianului date foarte utile.



Tabelul 8 prezintă reacțiile biochimice care individualizează genurile enterobacteriaceelor lactozopozitive.

Klebsiella pneumoniae. Tulpinile tipice dau reacțiile biochimice prezentate în tabelul 8. Pentru multe tulpini însă aceste reacții sînt variabile. Un test fidel de identificare a K. pneumoniae este patogenitatea pentru șoarece. Șoarecii inoculați sub-cutanat cu produsul patologic (spută ș.a.) sau intra-peritoneal cu 0,1 ml din diluția  $10^{-5}$  a culturii de 18-24 ore în apă peptonată fac o infecție septicemică mortală în 24-72 ore. La necropsie bacteria poate fi izolată din sîngele cardiac. Examenul microscopic o evidențiază pe frotiurile gram din sînge și splină cu morfologia caracteristică: bacil scurt, gros, gram-negativ, încapsulat (fig. 48)

#### Identificarea Enterobacteriaceelor lactozo-negative

(i) Izolații din materii fecale. Izolații care în testele preliminare de triaj dau reacții sugestive pentru Salmonella sau Shigella sînt identificați în continuare, după ce au fost verificați pentru puritatea culturii.

Restul tulpinilor (tulpinile ureazo-pozitive, cele care fermentează glucoza cu gaz și nu dau  $H_2S$



**Tabelul 8**

**Identificarea biochimică a Enterobacteriaceae-lor lactoză pozitive**

Testul	<i>Escherichia</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>
<b>Teste primare</b>					
Mobilitate	$\pm$ sau	+	-	+	+
Indol	+	-	-	-	-
Roșu metil	+	+	$\pm$ sau	-	-
Voges-Proskauer	-	-	+	+	+
Citrat (mediu Simmons)	-	+	+	+	+
H <sub>2</sub> S (mediu Hajna)	-	D	-	-	-
Urează	-	(+)	(+)	$\pm$ sau	-
Carbohidrați (acid din)					
Inozită	-	-	+G	d	+G
Lactoză	$\pm$ sau	$\pm$ sau	+	$\pm$ sau (+)	+
Sucroză	d	d	+	+	+
<b>Teste suplimentare</b>					
Amonită	-	-	$\pm$ sau *	$\pm$ sau	+
Dulcitate	d	$\pm$ sau	$\pm$ sau	$\pm$ sau	-
Malonat	-	$\pm$ sau	+	$\pm$ sau	$\pm$ sau
KCN	-	+	+	+	+
Phenilalanină (dezaminază)	-	-	-	-	-
Lizin decarboxilază	+	-	+	-	+
Ornitina decarboxilază	d	d	-	+	+
Arginin dihidrolază	d	+	-	+	-
Gelatină (22°C)	-	-	-	$\pm$ sau	$\pm$ sau (+)

Legenda: + = >90% pozitive în 1-2 zile,

- = >90% negative,

(+) = pozitiv tardiv,

$\pm$  sau = majoritatea culturilor pozitive,

$\pm$  sau = majoritatea culturilor negative,

x = târziu și neregulat pozitiv,

s = reacție slab pozitivă,

D = diferite reacții + (+) - date de diferite specii ale genului,

d = ibid., date de diferite tulpini ale speciei sau serotipuri.



etc.etc.) sînt trecute cu vederea: sînt saprofiti de contaminare normală.)

(ii) Izolații din probe provenite din zone normal sterile (urină\*\*, spută\*\*), bilă\*\*), sînge, lcr ș.a.). Din aceste produse se izolează Salmonella. Dar pot fi izolate oricare din celelalte Enterobacteriaceae. Shigella a fost izolată rar din din sînge și urină.

Identificarea acestor bacterii trebuie condusă pînă la stadiul care să permită

- clinicianului confirmarea diagnosticului clinic (salmonelloză, febră tifoidă, dizenterie) și diferențierea recăderii de reinfecție...)

- epidemiologului confirmarea diagnosticului de epidemie, identificarea tulpinii epidemice\*\*\*\*), depistarea purtătorilor sănătoși de Salmonella sau Shigella.

### Salmonella

Identificarea biochimică. Se înșămîntează medi-

\*) Rarele excepții de la această regulă vor fi discutate în capitolul 32.

\*\*) Vezi nota \*) de la p. 166.

...\*) In recăderi se reizolează aceeași tulpină pe cînd în reinfecții se izolează tulpini diferite.

\*\*\*\*\*) Tulpinile izolate din epidemie aparțin aceluiași serotip, lizotip și chiar pattern de sensibilitate la antibiotice.



ile pentru testele primare menționate în tabelul 9. Dacă pe baza acestor rezultate nu poate fi stabilită identitatea tulpinii, se recurge la testele biochimice adiționale.

Identificarea antigenică<sup>\*)</sup> a unei salmonele începe prin reacția de aglutinare pe lamă cu ser polivalent anti-O (vezi capitolul 6, p.91).



Fig.48 Klebsiella frotiu din sputa unui bolnav cu pneumonie (schematic)

- Dacă această reacție este pozitivă, identificarea se continuă prin reacții de aglutinare cu seruri anti-O de grup<sup>\*\*)</sup>. După stabilirea grupului, printr-o reacție de aglutinare cu seruri anti-H se face identificarea serotipului<sup>\*\*)</sup>.

În tabelul 10 este prezentată structura antigenică a unor salmonele mai frecvent izolate.

- Dacă triajul biochimic preliminar sugerează Salmonella typhi și izolatul nu aglutinează cu serul polivalent anti-O, se efectuează aglutinarea cu se-

<sup>\*)</sup> Salmonelele au largi înrudiri antigenice cu alte Enterobacteriaceae. De aceea, identificarea biochimică este obligatorie și nu se poate rezuma numai la testele de triaj și identificarea antigenică.

<sup>\*\*) Salmonelele sînt cuprinse în 60 grupe serologice și au peste 1000 de serotipuri.</sup>



Tabelul 9

Identificarea biochimică a Enterobacteriaceae-lor lactozoz-

negative

Testul	Edwardsiella	Salmonella	S. typhi	Arizona	Shigella	Serratia	Proteus vulgaris	P. mirabilis	P. rettgeri	P. morganii	Providencia	Yersinia
<u>Teste primare</u>												
Mobilitate (37°)	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
Indol	+	-	-	-	D	-	+	+	+	+	+	-
H <sub>2</sub> S (m. Hajna)	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
Ureează	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	D
Carbohidrați (acid din)												D
Dulcitate	-	D	șau (+)	-	d	-	-	-	-	-	-	-
Glucroză	+G	+G	+	+G	+ <sup>+</sup>	d	șau	+G	+	+G	D	+
Lactoză	-	-	-	d	D	șau (+)	-	-	-	-	-	-
Manită	-	+	+	+	D	+	-	-	șau	-	D	+
Sucroză	-	-	-	-	D	+	+	d	d	-	D	D
Pigment pe geloză	-	-	-	-	-	șau	-	-	-	-	-	-
<u>Teste adiționale</u>												
Salicină	-	-	-	-	-	+	d	d	d	-	-	D
Voges-Proskauer	-	-	-	-	-	+	-	șau	-	-	-	-
Citrat (m. Simmons)	-	+	-	+	-	+	d	șau (+)	+	-	+	-
Malonat	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
KCN	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
Phenilalanină (dezaminază)	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
Lizin-decarboxilază	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
Ornitin-decarboxilază	+	+	+	+	D	+	-	+	-	+	-	D
Arginin-dihidrolază	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Gelatină (22°C)	-	-	-	(+)	-	+	+	+	-	-	-	-

Legenda: vezi subsolul tabelului 8

\*) In ed. VIII-a a Bergey's Manual, Arizona își pierde individualitatea de gen; i-am păstrat individualitatea pentru rațiuni privind practica identificării în laboratorul de microbiologie clinică

\*\*) Unele biotipuri de Sh. flexneri produc gaz.



rul anti-Vi (antigenul O este mascat de antigenul de înveliș Vi).

Tiparea fagică. În scopuri epidemiologice, pentru unele salmonele (S.typhi, S.paratyphi B, S.typhimurium) se poate efectua tiparea fagică. Sînt determinări de competența laboratoarelor de referință.

### Tabelul 10

Structura antigenică a principalelor salmonele (după Kauffmann și White)

Specii	Antigen somatic	Antigen flagelar	
		Faza 1	Faza 2
	<u>Grupa A</u>		
S.paratyphi A	1,2,12	a	-
	<u>Grupa B</u>		
S.paratyphi B	1,4,5,12	b	1,2
S.typhimurium	1,4,5,12	i	1,2
S.heidelberg	1,4,5,12	r	1,2
	<u>Grupa C<sub>1</sub></u>		
S.paratyphi C	6,7 Vi	c	1,5
S.cholerae-suis	6,7	c	1,5
	<u>Grupa C<sub>2</sub></u>		
S.newport	6,8	c,h	1,2
S.bovis-morbificans	6,8	r	1,5
	<u>Grupa D</u>		
S.typhi	9,12 Vi	d	-
S.enteritidis	1,9,12	g,m	-
=====			



## Shigella

Shigelele se individualizează pe baza caracterelor biochimice prezentate în tabelul 9.

Genul *Shigella* cuprinde 4 subgrupe diferite biochimic și antigenic (tabelul 11).

### Tabelul 11

Diferențierea biochimică a subgrupelor (speciilor) de Shigella

Sub-grupa	Specia	Lactoză	Manită	Indol	Serotipuri
A	Sh.dysenteriae	-	-	d	10
B	Sh.flexneri	-	+	d	6
C	Sh.boydii	-	+	d	15
D	Sh.sonnei	(+)	+	-	1

Legenda = vezi tabelul 8

Identificarea antigenică a shigelelor presupune o reacție de aglutinare pe lamă cu seruri de grup (A, B, C, D). În cadrul fiecărei subgrupe, serotipurile sînt stabilite prin reacția de aglutinare pe lamă cu seruri monovalente.

## Proteus

Se individualizează de restul enterobacteriaceelor prin caracterul invaziv al culturii la suprafața mediului. Acest caracter nu se manifestă pe mediile selective cu bilă sau săruri biliare.

Identificarea celor 4 specii de Proteus se face pe baza caracterelor biochimice prezentate în



tabelul 9. Importanța acestei identificări pentru tulpinile infectante decurge din faptul că infecțiile cu Proteus mirabilis beneficiază de terapia cu penicilină.

### Yersinia

Genul se individualizează prin caracterele bi-ochimice prezentate în tabelul 9. Caracterele pe baza cărora se diferențiază cele 3 specii ale genului, Y.pestis, Y.pseudotuberculosis și Y.enterocolitica, apar în tabelul 12.

### Tabelul 12

Caractere distinctive între speciile de Yersinia (după Cowan, 1975).

Testul	<u>Y.pestis</u>	<u>Y.pseudo-</u> <u>tuberculosis</u>	<u>Y.entero-</u> <u>colitica</u>
Mobilitate			
22°C	-	+	+
37°C	-	-	-
Urează	- <sup>1)</sup>	+	+
Esculină	+	+	-
Rhamnoză	(d)	+	-
Salicină	d	+	-
Sucroză	-	-	+
Gaz din glucoză	-	-	-
$\beta$ -galactozidază	+	+	+
Ornitin			
decarboxilază	-	-	+
Indol	-	-	d

Legenda = vezi tabelul 8

<sup>1)</sup> Uneori pozitivă cu tulpini proaspăt izolate.



Yersinia pestis, agentul etiologic al ciumei sau pestei, este urmărită și trebuie identificată în puroiul sau serozitatea ganglionară în forma bubonică, în spută în forma pneumonică și în sânge în forma septicemică a pestei și în cadavrele șobolanilor.

Frotiul gram din produs patologic evidențiază bacili gram-negativi scurți, uneori pleomorfi, izolați, în perechi, rar în scurte lanțuri.

Pe frotiurile colorate Giemsa bacilii apar colorați bipolar.

Colorarea cu anticorpi fluorescenți a frotiurilor din produs patologic sau cultură tânără permite identificarea presumpțivă, rapidă a Y.pestis.

Cultura. Pe geloză nutritivă cultivă lent. Pe geloză sânge după 24 ore de incubare aerobă la 37°C formează colonii S, mici, transparente, nehemolitice.

Identificarea se face pe baza caracterelor biochimice prezentate în tabelul 12.

Y.pestis inoculată sub-cutan sau intra-peritoneal la cobai, șoarece sau șobolanul alb determină o infecție septicemică mortală.

Manipularea produselor patologice, a cadavrelor de șobolani și culturilor de Y.pestis și a animalelor inoculate se face cu măsuri de precauție deosebite (dezinfecția cadavrelor și animalelor, mască, ochelari, mănuși, evitarea aerosolilor ș.a.)

Yersinia pseudotuberculosis, agentul etiologic al pseudotuberculozei rozătoarelor, este izolată din ganglionii mezenterici și intestinul animalelor bolnave și al purtătorilor sănătoși. Ajunsă accidental, la om poate determina adenite mezenterice și, rar, septicemie fulgerătoare.

Yersinia enterocolitica poate provoca, din -



rezervorul animal în intestinul omului la care determină uneori adenite mezenterice sau enterocolite.

Identificarea acestor specii se face pe baza caracterelor rezumate în tabelul 12.

Antibiograma. Enterobacteriaceae-le sînt natural sensibile la antibioticele cu spectru larg și la antibioticele active numai asupra bacililor gram-negativi.

Proteus mirabilis este natural sensibil la penicilina G.

Larga circulație a fR printre aceste bacterii are ca rezultat apariția de variante și, ca urmare a selecționării acestora, de tulpini multirezistente la antibiotice. De aceea antibiograma se impune ca o necesitate pentru stabilirea antibioterapiei infecțiilor cu aceste bacterii.

**In concluzie**

Identificarea Enterobacteriaceae-lor patogene izolate din materii fecale se face pe baza caracterelor de cultură pe medii selectiv-diferențiale lactozate, a caracterelor biochimice și a structurii antigenice. Antibio-grama este necesară pentru stabilirea unei antibioterapii raționale a acestor infecții.



Identificarea Enterobacteriaceae-lor izolate din produse provenite din zone normal sterile se face pe baza caracterelor morfo-tinctoriale, de cultură, biochimice și a structurii antigenice. Antibiotograma este necesară pentru stabilirea unei antibioterapii raționale a acestor infecții.

./.



## 14 IDENTIFICAREA BACILILOR GRAM-NEGATIVI AEROBI NEFERMENTATIVI

Pseudomonas

Alcaligenes

Acinetobacter

Moraxella

Din această categorie de bacterii, cel mai frecvent izolat din infecții este Pseudomonas aeruginosa (bacilul piocianic). Saprofit oportunist, bacilul piocianic determină în special infecții exogene (infecții ale plăgilor și arsurilor, infecții urinare după instrumentații ale căilor urinare ș.a.), majoritatea în mediu spitalicesc la pacienți cu deficiențe în apărarea antiinfecțioasă.

Este relativ frecvent izolat ca saprofit de contaminare din materiile fecale, mai ales de la pacienți spitalizați și tratați cu antibiotice. În aceste condiții, la copilul mic poate determina și enterocolite. Pe medii selective și diferențiale cu lactoză formează colonii lactozo-negative care se pot confunda cu cele ale enterobacteriaceelor patogene. Replicate pe mediile de triaj, nu fermentează nici lactoza, nici glucoza (vezi tabelul 6).

Identificarea practică a bacilului piocianic se face pe baza caracterelor de cultură. Pe geloză nutritivă dezvoltă după 24 ore de incubare aerobă la 37°C colonii mari, cu margini neregulate și



tendință de a invade mediul în imediata vecinătate, ușor convexe, cu luciu metalic, colorate caracteristic în albastru-verzui ca urmare a elaborării de piocianină și fluoresceină, pigmenți difuzibili în mediu. Cultura degajă un miros caracteristic de iasomie. Pe geloză-sînge coloniile sînt hemolitice.

Aproximativ 4% din tulpinile bacilului piocianic nu produc piocianină. Se diferențiază de alte specii de Pseudomonas prin capacitatea de a oxida gluconatul în keto-gluconat, de a cultiva la 42°C și de a cultiva pe medii cu cetrinidă.

Pentru amănunte privind identificarea bacililor gram-negativ aerobi nefermentativi mai rar implicați în patologia infecțioasă (Ps.pseudomallei, agentul etiologic al melioidozei, boală întâlnită în Sud-Estul Asiei, Ps.mallei, agentul etiologic al morvei, zoonoză rar întâlnită la om, Alcaligenes, Acinetobacter, Moraxella) cei interesați pot consulta cu folos bibliografia indicată (Bailey și Scott, 1974; Buttiaux și colab., 1969).

Antibiograma. Bacilul piocianic este natural sensibil la antibioticele active asupra bacililor gram-negativi și la antibioticele cu spectru larg. Prin transfer de factor R dezvoltă repede rezistență la multiple antibiotice. De aceea, antibioterapia infecțiilor cu bacil piocianic impune imperios antibiograma.



**In concluzie**

Identificarea bacilului piocianic se face în principal pe baza caracterelor de cultură. Studiul caracterelor biochimice este necesar pentru identificarea tulpinilor nepigmentogene. Antibiotograma este indispensabilă pentru antibioterapia infecțiilor cu bacil piocianic

./.



15 IDENTIFICAREA COCOBACILILOR GRAM-NEGATIVI  
AEROBI SAU FACULTATIV ANAEROBI

Haemophilus

Pasteurella

Bordetella

Brucella

Francisella

Cu interes pentru patologia infecțioasă sînt cocobacilii gram-negativi facultativ anaerobi din genurile\*) Haemophilus și Pasteurella și cei aerobi din genurile\*) Bordetella, Brucella și Francisella.

Mai frecvent implicate în infecțiile omului sînt speciile de Haemophilus și Bordetella.

Pasteurella, Brucella și Francisella determină zoonoze și numai accidental infecții ale omului.

Genul Haemophilus

Genul Haemophilus reunește cocobacili gram-negativ dependenți de 2 factori de creștere prezenți în sînge:

\*) Genuri cu afiliere incertă, conform Manualului Bergey, ed.a 8-a, 1975. Curent, sînt reunite sub numele generic de Parvobacteriaceae, denumire care nu desemnează însă o categorie taxonomică.



factorul X, o substanță termostabilă care este hemina,

factorul V sau vitaminic, o substanță termolabilă care este coenzima I (nicotin-amid-adenin-dinucleotid = NAD). Factorul V este furnizat și de cultura unor bacterii cum este stafilococul auriu.

### Haemophilus influenzae

Este un comensal oportunist al căilor respiratorii superioare. La copilul mic (2 luni-3 ani) determină infecții mai frecvente și mai grave decât la adulți. În calitate de contaminant normal, poate fi izolat în cantități reduse din exsudatul faringian și spută.

Ca bacterie infectantă, este urmărit și trebuie identificat în produsele patologice ale infecțiilor pe care le determină: sputa în infecțiile căilor respiratorii inferioare, exsudatul laringian în epiglotita și laringo-traheita obstructivă a copilului mic, lor în meningitele purulente ale copilului și rar ale adultului, sîngele în septicemii, exsudatul conjunctival în conjunctivite.

Frotiul Gram din produs patologic evidențiază cocobacili gram-negativ, obișnuit capsulați, așezați izolat sau în scurte lanțuri.

Cultura apare după 24 ore la 37°C.

Pe geloză-sînge cu striu de stafilococ auriu, la izolarea din organism, dezvoltă colonii mici, S, transparente, nehemolitice, satelite culturii de





stafilococ. Coloniile din imediata vecinătate a culturii de stafilococ dispun de o cantitate sporită de factor V și sînt mai mari decît cele de la distanță.)

Se dezvoltă bine pe geloză chocolate (încălzirea sîngelui la 80°C favorizează eliberarea în mediu a factorilor X și V și distruge enzimele care inactivează factorul V).

Reacții de aglutinare, de precipitare sau umflare a capsulei cu seruri imune specifice permit identificarea celor 6 tipuri antigenice (a,b,c,d,e,f). În subculturi pierde capsula și dezvoltă colonii R care nu pot fi identificate antigenic.

H. haemolyticus, H. parainfluenzae, H. parahaemolyticus sînt comensali oportuniști care pot contamina normal probele de exsudat faringian și spută. Rar sînt cauza unor infecții respiratorii. Tot rar, ultimile 2 specii au fost izolate în hemoculturi de la bolnavi cu endocardită subacută.

Diferențierea speciilor hemolitice de streptococi  $\beta$ -hemolitici se face pe baza caracterelor morfo-tinctoriale.

Identificarea acestor specii se face pe baza caracterelor de cultură și necesităților nutritive menționate în tabelul 13.

---

Pe geloză-sînge de oaie, la distanță de striul de stafilococ coloniile de H. influenzae nici nu apar.



Tabelul 13

Principalele caractere pe baza cărora sînt identificate speciile de Haemophilus izolate din infecții ale omului.

Specia	C u l t i v a r e a    în					Hemo- liză <sup>1)</sup>	Hemaglu- tinarea <sup>2)</sup>
	Apă	Apă peptonată			cu factor		
	peptonată	X	V	X+V			
H:influenzae	-	-	-	+	-	-	
H.haemo- -lyticus	-	-	-	+	+	-	
H.para- -influenzae	-	-	+	+	-	-	
H.parahaemo- -lyticus	-	-	+	+	+	-	
H.aegyptius	-	-	-	+	-	+	
H.ducreyi	-	+	-	+	±	-	

<sup>1)</sup> Pe geloză sînge

<sup>2)</sup> Pe o lamă de microscop se depun alături

- o picătură din soluția 0,5% NaCl în care se face o suspensie densă din cultura bacteriei pe geloză-cho-  
colat;

- o picătură din suspensia 0,5% de hematii de om în aceeași soluție salină.

Se amestecă cu așua cele 2 picături. Dacă tulpina studiată posedă o hemaglutinină, hematiile aglutinează imediat vizibil cu ochiul liber.

*Haemophilus aegyptius* este căutat și trebuie i-  
dentificat în exsudatul conjunctival de la bolnavii  
cu conjunctivite acute. Identificarea se face pe baza  
caracterelor menționate în tabelul 13.

*Haemophilus ducreyi* este agentul etiologic al  
șancrului moale.



Protiul Gram din exsudatul sancrului moale e-  
vidențiază un cocobacil gram-negativ colorat bipo-  
lar (aspect de suveică) așezat izolat sau în lan-  
țuri (aspect de lanț de bicicletă), intra sau extra-  
celulari.

Cultura. Cultivarea este dificilă. După 48 ore  
de incubare la 37°C în aerobioză, pe geloză cu 30%  
sînge de iepure formează colonii mici, S, cenușii  
opace, care alunecă înaintea ansei. Diferențierea  
de alte specii de hemofili se face pe baza caracte-  
relor menționate în tabelul 13.

Antibiograma. Hemofiliile sînt natural sensibili  
la antibioticele cu spectru larg. Au fost semnalate  
tulpini de H. influenzae cu rezistență dobîndită. De  
aceea, antibiograma a devenit necesară pentru anti-  
bioterapia acestor infecții.

#### In concluzie

Speciile de Haemophilus se identifică pe baza  
caracterelor morfotinctoriale, de cultură și  
a necesităților nutritive în factor X și V.  
Pentru tulpinile infectante antibiograma este  
necesară.

#### Genul Bordetella

Genul Bordetella reunește agenții etiologici ai  
tusei convulsive și ai unor infecții respiratorii a-  
semănătoare clinice tusei convulsive, dar mai puțin



grave.

Bordetella pertussis

- tuse măgălașă

B. pertussis, agentul etiologic al tusei convulsive, este urmărit și trebuie identificat în exsudatul nazo-faringian al bolnavilor suspecti de tuse convulsivă și, de asemenea, în picăturile Flugge eliminate în cursul unui acces de tuse.

Protiul Gram din produs patologic evidențiază coccobacili gram-negativi, cu tendință la colorare bipolară, capsulați și dispuși izolat, în perechi și ocazional în scurte lanțuri.

Cultura. Strict aerob, la izolarea din organism cultivă numai pe medii complexe.

Pe mediu (Bordet-Gengou)<sup>\*</sup> (agar-infuzie de cartof glicerinată cu 30% sînge) după 72-96 ore la 37°C formează colonii mici, S, bombate, cu luciu caracteristic de picătură de mercur înconjurată cu o zonă de hemoliză.

În subculturi pierde capsula, se degradează antigenic, și poate cultiva pe medii uzuale.

B. pertussis se diferențiază de celelalte specii ale genului prin caracterele biochimice și structura antigenică (vezi tabelul 14).

B. pertussis proaspăt izolată din organism, capsulată, poate fi identificată antigenic prin reacția

\* Adăugarea la mediu a penicilinei în cantitate de 0,25-0,5 u/ml favorizează izolarea bacteriei prin inhibarea contaminanților gram-pozitivi.



de aglutinare pe lamă cu seruri specifice sau prin colorare directă cu anticorpi fluorescenți.

Tabelul 14

Caractere diferențiale ale speciilor de Bordetella

Caracterul	B.pertussis	B.para-pertussis	B.bronchiseptica
Creșterea pe agar peptonă	-	+	+
m.Bordet-Gengou în 1-2 zile	-	+	+
în 3-4 zile	+	..	..
Innegrirea mediului	-	+	-
Mobilitate	-	-	+
Nitrat → nitriți	-	-	+
Ureaza	-	+	+
Aglutinarea cu ser anti-pertussis	+	+ sau -	-
poligrup	..	..	..
Aglutinarea cu ser anti-pertussis	+ sau -	-	-
grup X	..	..	..
Aglutinarea cu ser anti-parapertussis	-	+	-
grup X	..	..	..
Aglutinarea cu ser anti-bronchiseptica	+ sau -	-	+

B.pertussis în produsele patologice și în primoculturi conține antigenul de suprafață K, care posedă mai multe fracțiuni; una dominantă (antigenul „major”), specifică, și altele comune cu alte specii de Bordetella (antigene X „minore”). Pe baza antigenului K major, B.pertussis este împărțită în 3 grupe antigenice: X (cu 3 serotipuri - 2,3,4), I și C. De aceea, pentru identificarea antigenică se folosește un ser anti-B.pertussis poligrup (X,I,C), saturat cu antigenele minore comune altor specii, și un ser de grup X de asemenea



saturat cu antigenele minore comune.

Bordetella parapertussis și B. bronchiseptica sînt agenții etiologici ai unor infecții respiratorii asemănătoare tusei convulsive dar cu evoluție mai benignă. Se diferențiază între ele și de B. pertussis prin caracterele menționate în tabelul 14.

### Genul Brucella

Genul Brucella cuprinde 3 specii importante care determină infecții ale caprelor, oilor, vitelor, porcilor ș.a. și accidental ale oamenilor care vin în contact cu animalele bolnave sau produse provenite de la acestea: B. melitensis, B. abortus, B. suis.

Paraziți intra-celulari, brucelele invadează pe cale sanguină țesuturile organismului bolnav. La animalele gestante invadează produsul de concepție și-l omoră determinînd avortul - avortul enzootic al animalelor domestice.

La bolnav brucelele sînt izolate cel mai frecvent din sînge. Au mai fost izolate din măduva osoasă, biopsii ganglionare, urină, lor ș.a. în funcție de localizarea secundară a leziunilor.

La animalul bolnav brucelele sînt căutate în avorton și în lapte.

Izolarea brucelelor se face pe medii de cultură. Se poate face și prin inoculare la cobai (utilă în special pentru izolarea brucelelor din produse cu floră de contaminare). La animalele inoculate (2 pentru fiecare produs) se urmărește apariția anticorpilor anti-Brucella la 3 săptămîni și 5-6 săptămîni de la inoculare. La 8 săptămîni de la inoculare animalele sînt sacrificate și se încearcă izolarea brucelelor pe medii de cultură din broiatele de organe (splină, ficat, ganglioni limfatici, rinichi).

Frotiul gram din produs patologic de la bolnav este frecvent negativ.





### Cultura

Pe geloză cu infuzie de ficat în aerobioză și atmosferă cu 5-10% dioxid de carbon, la 37°C brucelele formează după 48-96 ore colonii mici, S, transparente. În primocultură, adaptarea acestor organisme parazite la mediu artificial poate dura 2-4 săptămâni.

Frotiul gram din cultură evidențiază mici coccobacili gram-negativ, uneori polimorfi.

Identificarea genului Brucella se bazează pe următoarele caractere biochimice principale: producerea de urează și absența fermentării zaharurilor.

Diferențierea celor 3 specii principale de Brucella se face pe baza caracterelor consemnate în tabelul 15.

Tabelul 15

Caractere diferențiale ale speciilor de Brucella

Caracterul	Br.melitensis	Br.abortus	Br.suis
Necesitatea CO <sub>2</sub> la izolare	-	+	-
Producerea de H <sub>2</sub> S	-	(numai pri- (timp de mele 2 și- 4 zile) le)	
Cultivarea în prezența fucsinei bazice	+	+	-
thioninei	+	-	+
Aglutinarea cu ser anti-melitensis	+	-	-
Aglutinarea cu ser anti-abortus	-	+	+

Reacția de aglutinare cu seruri monospecifice permite diferențierea Br.melitensis de Br.abortus și Br.suis, dar nu diferențiază ultimele 2 specii între ele deoarece conțin, în cantități aproximativ egale, un antigen comun (tabelul 15).

\*) Cantitățile reduse de acizi rezultate din catabolizarea lentă a zaharurilor de către brucele sînt mascate de amoniacul produs prin dezaminarea aminoacizilor.



### Genul Francisella

Francisella tularensis este o bacterie patogenă care în natură determină infecții ale rozătoarelor sălbatice. Accidental infecția este transmisă la om prin contact direct (manipularea animalelor infectate) sau prin artropode hematofage infectate pe animale bolnave.

La omul bolnav, în funcție de forma clinică a bolii, Fr. tularensis este căutată și trebuie identificată în sînge (șanse mai mari de izolare în prima săptămână de boală), în spută, în exsudatul conjunctival.

Frotiul gram din produs patologic de la bolnav, obișnuit nu evidențiază germenul.

La izolarea din produs patologic de la om sau animal natural infectat, adaptarea pe medii artificiale nu este posibilă fără inocularea prealabilă la șoarece sau cobai.

Inocularea (intra-peritoneală sau sub-cutanată) la șoarece sau cobai constituie în același timp metoda de izolare și identificare pentru Fr. tularensis. Șoarecii inoculați fac o boală septicemică mortală în 3-6 zile. Germeul se izolează din sîngele cardiac. La necropsie se observă, cu lupa, pe suprafața splinei și ficatului hipertrofiate, noduli necrotici. Amprentele de ficat colorate Giemsa evidențiază macrofage transformate în aievărate pline cu coccobacili. Frotiurile gram din splină, ficat, sînge evidențiază numeroși coccobacili gram-negativi foarte mici.

Cultura se obține numai pe medii speciale înogățite, după 2-5 zile de incubare aerobă la 37°C.

Pe mediul Francis (galoză-sînge-cistină-dextroză) formează colonii mici transparente mucoide.

Identificarea se face pe baza spectrului de fermentare al zaharurilor (fermentează fără gaz glucoză, maltoză și manoza) și prin aglutinarea cu ser specifici.

./.

\*) Manipularea animalelor inoculate se face de către personal vaccinat anti-tularemic.



16 IDENTIFICAREA BACILILOR GRAM-POZITIV  
AEROBI NESPORULATI

Corinebacterii aerobe

Listeria

Erysipelothrix

Genul Corynebacterium

Genul Corynebacterium reunește bacili gram-pozitivi pleomorfi, frecvent cu extremitățile măciucate și structură granulară, imobili, nesporulați, așezați caracteristic sub formă de litere chinezești sau palisade. Unele specii sînt aerobe, altele facultativ anaerobe, iar altele anaerobe (pentru acestea din urmă vezi capitolul 20, p. 210).

Specia tip este Corynebacterium diphtheriae care trebuie diferențiată de bacilii difterimorfi.) (C.pseudodiphthericum și C.xerosis) care habitează mucoasa respiratorie superioară, mucoasa genitală, conductul auditiv extern.

Corynebacterium diphtheriae

C.diphtheriae este agentul etiologic al toxinfecției difterice. Il urmărim și trebuie să-l i-

\*) Specia C.acnes, care habitează tegumentele, este în prezent inclusă în genul Propionibacterium:  
Propionibacterium acnes.



identificăm în exsudatul faringian de la bolnavii cu angină difterică (cea mai frecventă localizare a bolii). Localizările la nivelul plăgilor sînt rare.

Pentru depistarea purtătorilor sănătoși de bacil difteric se examinează exsudatul nazal și cel faringian.

Frotiul Gram din produs patologic evidențiază bacili gram-pozitiv la limită, inegal calibrați, pleomorfi cu extremitățile măciucate, uneori ramificați, dispuși sub forma literelor chinezești.

Frotiul colorat cu albastru de metilen Loeffler evidențiază mai bine structura granulară a bacilului: bacilii se colorează în albastru iar granulațiile metaacromatice (granulațiile Babeș-Ernst) se colorează în roz și sînt dispuse predominant polar.

Morfotinctorial, între bacilul difteric, bacilii difterimorfi și actinomycete nu pot fi făcute diferențieri.

### Cultura

(i) Pe mediul Loeffler (bulion glucozat cu ser de bou coagulat) după 12-18 ore de incubare aerobă la 37°C dezvoltă colonii mici opace.

(ii) Pe geloză sînge cu telurit de potasiu (medii selective-diferențiale) după 24 ore la 37°C formează colonii cenușii sau negre caracteristice. Aspectul coloniilor pe aceste medii diferă după cele 3 tipuri ale bacilului difteric: gravis, mitis



și intermedius.) (vezi tabelul 16).

Morfologia se studiază numai în frotiul din cultura pe mediul Loeffler, singura care evidențiază granulațiile metacromatice.

Identificarea se continuă cu cercetarea caracterelor biochimice menționate în tabelul 16 și testul pentru toxigeneză.

Testul pentru toxigeneză se face *in vitro* sau *in vivo*.

Testul *in vitro* (testul Elek) este un test fidel și economic (vezi capitolul 6, p. 89).

Testul *in vivo*

Dintr-o colonie suspectă se însămânțează un tub cu mediu Loeffler și unul cu bulion infuzie. După 24 ore la 37°C se verifică puritatea culturii prin frotiu de pe mediu Loeffler. Cultura în bulion servește pentru testare după 48 ore la 37°C.

(i) Inocularea sub-cutanată la cobai dă cele mai sigure rezultate. Se folosesc 2 cobai. Unul este imunizat prin inocularea intra-peritoneală a 500 U antitoxină difterică cu 2 ore înainte de testare. Apoi la ambii cobai se inoculează sub-cutan 1 ml de cultură.

Dacă tulpina cercetată este toxigenă, cobaiul neprotejat moare în cca 3-4 zile cu semne caracteristice toxinfecției difterice: edem gelatinos-fibrinos la locul de inoculare, lichid sero-sangvinolent în cavitățile seroaselor, hipertrofie, congestie și hemoragii în supra-renale. Martorul protejat cu antitoxină difterică supraviețuiește prezentând

Pe mediile selective cu telurit, în afară de bacilul difteric, se mai dezvoltă formând colonii cenușii sau negre și bacilii difterimorfi, enterococii, stafilococii. Pe mediul Tinsdale (mediu selectiv cu telurit dar fără sînge) bacilul difteric formează colonii care se înconjoară cu un halou brun care lipsește la difterimorfi ș.a. Acest mediu nu diferențiază cele 3 tulpini ale bacilului difteric.



Tabelul 16

Caractere diferențiale pentru bacilul difteric și bacilii difterimorfi

Specia	Morfologia	Aspectul colo- niilor pe geloză-sînge cu telurit de potasiu	Hemoliza	Amidon/glicogen	Glucoză	Sucroză	Ureează	Toxigena
C.diphtheriae tip gravis	scurți, colorați uniform	cenușiu închis mari, plate, us- cate, crenelate („floare de margaretă”)	-	+	+	-	-	+
C.diphtheriae tip mitis	lungi cu multe gra- nulații metaacroma- tice	negre, mici, lucioase, bombate	+	-	+	-	-	+
C.diphtheriae tip interme- dius	lungi cu capete mă- ciucate și granulații metaacroma- tice	cenușii cu centrul negru, acuminate, uscate	-	-	+	-	-	+
C.pseudodiph- thericum	scurți, în palisade, colorați uniform	mici, cenușii cu centrul mai închis, lucioase	-	-	-	-	+	-
C.xerosis	lungi, asemănă- tori b. difteric	mici, negre, lucioase	-	-	+	+	-	-



numai o reacție inflamatorie minimă la locul de inoculare.

Dacă tulpina este slab toxigenă, cobaiul test slăbește progresiv și la 15-20 de zile de la inoculare prezintă paralizii. La locul de inoculare poate prezenta o escară.

(ii) Inocularea intra-dermică la cobai sau iepuri permite testarea mai multor tulpini pe același animal.

Se epilează flancurile animalului. Zonele epilate se împart în arii de 2 cm lungime. Fiecare cultură de testat se inoculează în volum de 0,2 ml în câte o arie a unui flanc.

După 5 ore\*) animalele sînt inoculate cu 500 u anti-toxină difterică (iepurii intra-venos iar cobaii intra-peritoneal)

După 30 min. de la inocularea antitoxinei, se inoculează intra-dermic culturile test, în volum de 0,2 ml și în aceeași ordine, în ariile flancului opus. Aceștia vor fi martorii post-antitoxină.

Citirea se face după 24-48 ore. La nivelul de inoculare al tulpinilor toxigene apare o zonă necrotică cu diametrul de 5-10 mm înconjurată cu o arie mai largă de eritem. Martorul corespunzător prezintă cel mult o mică zonă eritematocasă.

Pentru fiecare testare trebuie inclus un martor pozitiv - cultură toxigenă de bacil difteric.

#### In concluzie

Bacilul difteric se identifică pe baza caracterelor morfo-tinctoriale, de cultură, biochimice și a toxigenezei.

\*) In acest interval seringile încărcate cu culturile de testat sînt menținute la frigider.



## Genul Listeria

Listeria monocytogenes, specia tip a genului, determină în natură infecții ale animalelor sălbatice sau domestice. Accidental infectează omul.

L.monocytogenes este izolată, și trebuie identificată, din sînge în formele septicemice ale infecției, din lor în formele meningo-encefalitice ale infecției, din lohii, placentă în infecții intrauterine urmate de avort sau naștere de făt mort. La necropsie se încearcă izolarea din organe (creier, ficat, splină).

Frotiul Gram din produs patologic evidențiază un bacil fin gram-pozitiv, izolat sau în scurte lanțuri, intra sau extracelular.

### Cultura

(i) Pe geloză-sînge după 24 ore la 37°C dezvoltă, la izolarea organism, colonii S, de mărime milonice,  $\beta$ -hemolice. Frotiul Gram evită confuzia cu streptococii hemolitici.

La 4°C cult apare după 4-7 zile de incubare (bacterie psihrotrophă).<sup>\*)</sup>

(ii) Cultivă pe medii cu telurit de potasiu formînd după 48 ore la 37°C colonii asemănătoare cu

---

<sup>\*)</sup> Dacă prima tentativă de izolare nu reușește (cazul produselor cu floră de contaminare, îndeosebi), produsul patologic se menține, suspensionat în bulion, la 4°C urmînd a se repeta periodic tentativa de izolare. În aceste condiții, flora de contaminare este inhibată și se realizează o veritabilă îmbogățire a produsului cu L.monocytogenes.



ale bacililor difterimorfi.

Pentru identificare se cercetează mobilitatea și patogenitatea pentru iepure.

Mobilitatea se cercetează pe culturile incubate la 22-26°C. Se face un examen între lamă și lamă a culturii în bulion glucozat sau se face o înșămânțare prin înțepare profundă în coloană de geloză moale.

Testul de patogenitate. Iepurii inoculați în sacul conjunctival cu cultura de 24 ore, proaspăt izolată, fac o cherato-conjunctivită purulentă. Unele animale se vindecă spontan după 6-7 zile; altele mor prin meningo-encefalită.

Identificarea definitivă se face pe baza caracterelor biochimice și antigenice.

### Genul Erysipelothrix

E-rysipelothrix (bacilul rujetului) este agentul etiologic al erizipelului porcului. În natură determină infecții și la alte diverse specii animale (șoareci, păsări ș.a.) la om infecția apare cu precădere la lucrătorii din abatoare, măcelari. Se manifestă ca o dermatită asemănătoare clinic erizipelului, localizată cu precădere la mâini.

E-rysipelothrix poate fi izolat din biopsie cutanată și din sânge în formele septicemice. Inocularea intra-peritoneal la șoarece a suspensiei de material biopsic mărește șansele de izolare; cultura pură este obținută în 24 ore din sângele cardiac.

#### Cultura

La izolarea din organism formează pe geloză-sânge, după incubare aerobă<sup>1</sup> peste noapte la 37°C, colonii mici,

<sup>1</sup>) E-rysipelothrix este microaerofil dar poate cultiva atât în aerobioză cât și în anaerobioză.



S ( $\beta$ -hemolitice pe mediile cu 10% sînge de cal).

Frotiul Gram arată un bacil fin gram-pozitiv. Spre deosebire de L. monocytogenes, este imobil și inoculat în sacul conjunctival la iepure determină numai o conjunctivită benignă fără cheratită.

•/•



17 IDENTIFICAREA BACILILOR GRAM-POZITIVI  
SPORULATI AEROBI

Bacillus anthracis

Bacilii antracoizi

Toți bacilii gram-pozitivi sporulați aerobi sînt incluși în genul Bacillus, care conține numeroase specii. Majoritatea acestora sînt lipsite de patogenitate pentru om sau se comportă, mai rar, ca microorganisme cu patogenitate condiționată (B.cereus, B.subtilis ș.a.) Saprofiți ai solului, au o largă răspîndire în natură putînd contamina tegumentele sau mucoasele omului. Deoarece morfo-tinctorial se aseamănă cu specia patogenă a genului, B.anthraxis, sînt desemnați sub denumirea de bacili antracoizi.

Importanța practică a cunoașterii bacililor antracoizi este îndeosebi de a-i diferenția de singura specie redutabil patogenă, B.anthraxis, și de a-i recunoaște ca posibili contaminanți ai unor produse normale sau patologice recoltate de la om.

B.anthraxis este agentul etiologic al antraxului la om și animale. Boala, relativ rară la om, îmbracă mai ales un aspect profesional evoluînd fie sub forma pustulei maligne sau edemului malign (căr-bune extern sau cutanat) fie, mult mai rar, și de o



gravitate extremă, ca o bronho-pneumonie sau enterită carbunoasă. Toate cele 3 localizări pot determina generalizare: septicemică.

B.anthraxis, la omul bolnav, poate fi cercetat, în funcție de localizare, în produsele recoltate de la nivelul leziunii cutanate, spută, materii fecale, sînge, lichid cefalo-rahidian.

Frotiul colorat Gram din produse patologice pune în evidență bacili gram-pozitivi cu extremități tăiate drept, izolați sau în lanțuri scurte (2-3 bacili), înconjurați de o capsulă a cărei prezență poate fi mai ușor marcată după colorația metacromatică cu albastru de metilen.

Prezența capsulei diferențiază B.anthraxis de toți bacilii antracoizi.

Sporul sferic sau ovoid, dispus central sau paracentral, fără să deformeze semnificativ forma bacilului, nu apare decât în frotiul din cultură unde și bacilii au o dispoziție predominant în lanțuri (fig.49).

Cultura se dezvoltă după 18-24 ore în condiții de aerobioză la 37°C chiar pe mediile de bază: buillon și geloză nutritivă.

Pe geloză-sînge, mediu recomandat pentru izolarea B.anthraxis din produse patologice, cultivă sub formă de colonii mari, rotunde, cu margini neregulate, opace, usoate și mate (de tip R), invariabil



nehemolitice.

Sporularea culturilor este favorizată de prezența oxigenului și temperaturi mai joase (20-30°C) fiind inhibată la peste 42°C.

Capsula este sintetizată numai pe medii bogate în albumine sau bicarbonatate și în atmosferă cu bioxid de carbon.

Studierea unor caractere biochimice este importantă pentru diferențierea *in vitro* a

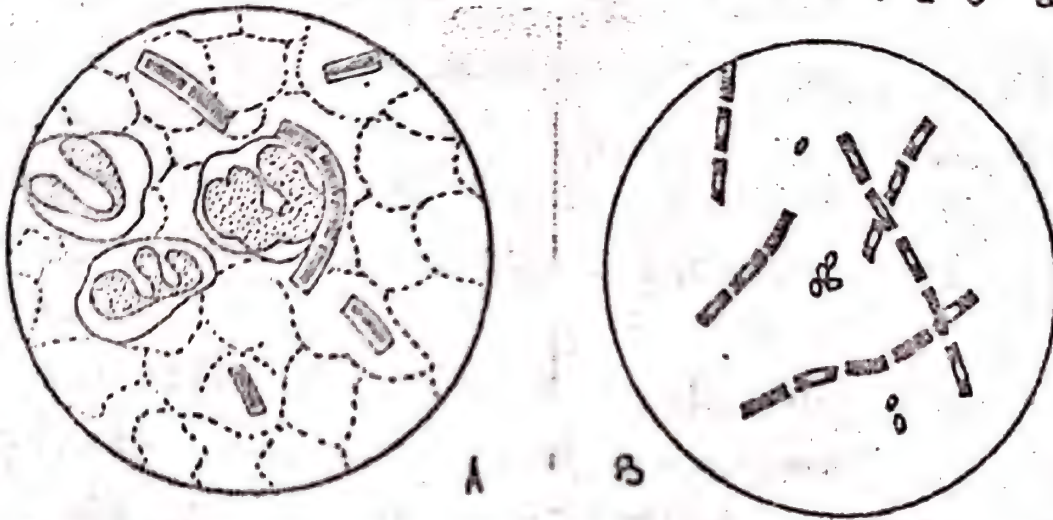


Fig.49 Bacillus anthracis. A-frotiu din produs patologic; B-frotiu din cultură.

B.anthraxis de bacilii antracoizi și în special de b.cereus (tabelul 17).

Caracterul diferențial major între B.anthraxis și bacilii antracoizi este patogenitatea pentru animalele de laborator.

Un mare număr de specii animale sînt sensibile la infecția carbunoasă experimentală. Cei mai utilizați sînt șoarecii. Cultura spălată a microorganism-



Tabelul 17

Caractere diferențiale între B.anthraxis și B.cereus

Caracterul	B.anthraxis	B.cereus
Mobilitate	-	+
Hemoliză pe geloză-sînge	-	+
Lichefierea gelatinei	-	+
Lecitinaza	(sau f.lentă)	+
	(sau slab pozitivă)	
Fag gamma	sensibil	rezistent
Penicilină G 10 u/ml	sensibil	rezistent
Patogenitatea pentru animal	+	-

mului de testat\*) este inoculată sub-cutanat sau intraperitoneal. B.anthraxis determină o infecție septicemică mortală în 2-5 zile, bacteria putînd fi ușor evidențiată în sînge (hemocultură) și pe ampren-te de organ (splină, ficat ș.a.)

Antibiograma. B.anthraxis este sensibil la anti-bioticele active asupra bacteriilor gram-pozitive. Deoarece s-au semnalat tulpini cu rezistență dobîndi-tă, antibiograma a devenit necesară și pentru trata-mentul antimicrobian al antraxului.

B.cereus este natural rezistent la penicilină.

\*) B.cereus poate produce în mediul de cultură pro-duși toxici de metabolism care pot cauza moartea animalelor inoculate.



## IDENTIFICAREA BACILILOR GRAM-POZITIVI SPORULATI ANAEROBI

Clostridium tetani

Clostridium botulinum

Clostridiile gangrenei gazoase

Bacilii gram-pozitivi sporulați anaerobi sînt cuprinși în genul Clostridium, care include peste 300 de specii larg răspîndite în natură: sol, praf, apă, alimente, conținutul intestinal la om și animale.

Dintre numeroasele specii, un număr redus prezintă interes medical și anume:

Cl.tetani, care determină toxiinfecția tetanică;

Cl.botulinum, care cauzează intoxicația botulinică și

Cl.perfringens, Cl.sordellii, Cl.septicum, Cl.novyi, Cl.histolyticum ș.a. care în variate asociații reprezintă agenții etiologici ai gangrenei gazoase.

Identificarea acestor specii se face pe baza caracterelor morfo-tinctoriale (prezența caracteristică a sporilor), de cultivare (anaerobi), biochimice, a toxinelor elaborate sau prin testul de patogenitate pentru animal.



Frotiul din cultură pune în evidență bacili gram-pozitivi, cu extremități rotunjite, sporulați. Sporul, de obicei ovalar, depășește diametrul transversal al bacilului; are dispoziție subterminală sau centrală; excepție face Cl. tetani la care sporul este sferic, terminal (fig.50).

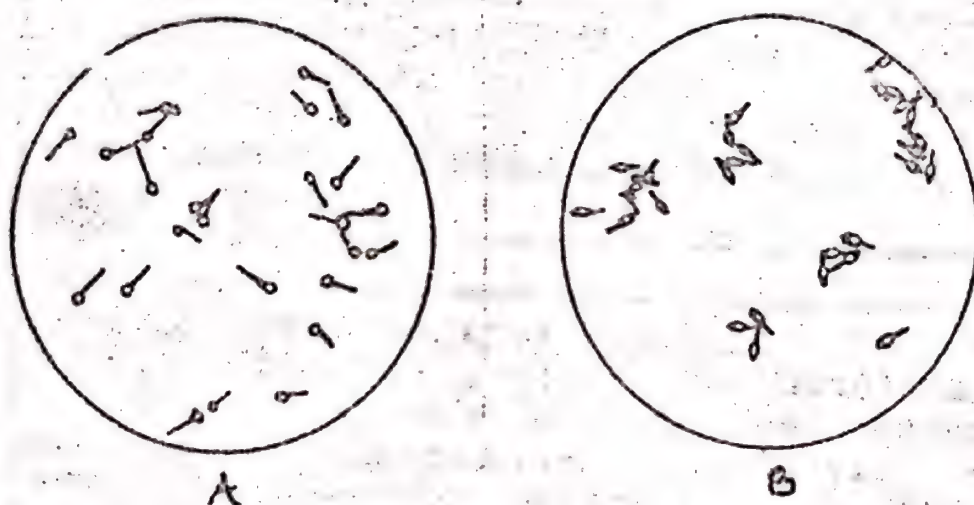


Fig.50 Frotiu din cultură de Cl. tetani (A) și Cl. botulinum (B)

În frotiul din produse patologice sporul poate lipsi; Cl. perfringens se poate prezenta capsulat.

Cultura se obține numai în condiții anaerobe (vezi capitolul 3, p.58) după 18-24 ore de incubare la 37°C.

În geloză moale dau colonii pufoase, unele invadante, în afară de Cl. perfringens, singura specie imobilă, și variantele aciliate ale speciilor mobile care cultivă sub formă de colonii lenticulare.

Aspectul coloniilor pe geloză sînge este variabil, mai distinctă fiind coloniile de Cl. perfringens



care formează o zonă dublă de hemoliză: o zonă clară de hemoliză imediat în vecinătatea coloniei și o altă zonă de hemoliză incompletă la periferie (hemoliza este absentă pe geloză cu sînge de cal).

Bulionul VF este tulburat intens cu degajarea de bule de gaz și miros fetid.

Identificarea biochimică se bazează îndeosebi pe spectrul fermentativ al zaharurilor și prezența sau absența activității proteolitice a tulpinii.

Identificarea tipului de exotoxină sau a unor exoenzime elaborate reprezintă testul major de identificare.

Clostridium perfringens poate fi ușor identificat prin testul Nagler care evidențiază neutralizarea specifică prin antitoxină a efectului lecitinazei ( $\alpha$ -toxina) după însămînțarea tulpinii pe un mediu cu gălbenuș de ou.

Toxina tetanică precum și tipurile de toxină botulinică (cu importanță pentru om tipurile A, B și E) sau cele elaborate de C. perfringens (A și C) pot fi identificate pe baza testelor de seroneutralizare pe șoarece. Supernatantul centrifugatului de cultură\* se inoculează intra-peritoneal la șoarece: ca atare (la lotul martor) sau după amestec prealabil în proporție 4:1 cu ser antitoxic polivalent sau de tip. Se urmăresc animalele, în medie 5 zile. Lotul martor și loturile la care serul antitoxic nu a asigurat protecția prezintă paralizii și în final animalele mor. Toxina este identificată de serul care a asigurat neutralizarea

\*) Pentru toxina tetanică se lucrează și cu diluții de cultură.



sa.

Pentru agenții etiologici ai gangrenei gazoase se poate studia patogenitatea integrală a tulpinii (virulența + toxigeneza), folosindu-se inocularea culturii intramuscular la cobai. La animalele decedate se urmăresc atât aspectul culturii cât și eventualele epansamente sero-sanguinolente de la nivelul cavităților seroaselor. În leziunea locală și uneori la nivelul organelor poate fi pus în evidență, prin frotiuri și cultură, agentul infectant.

Identificarea bacilului tetanic în laboratorului de microbiologie clinică este rareori necesară: diagnosticul tetanosului este favorizat de simptomatologia deosebit de caracteristică.

Identificarea toxinei botulinice în vărsături, conținutul gastric sau intestinal aspirat cu sonda sau în sânge, este aceea care confirmă diagnosticul clinic și indică serul monospecific pentru terapie. Identificarea bacilului botulinic nu constituie un scop pentru laboratorul de microbiologie clinică.

Izolarea și identificarea clostridiilor gangrenei gazoase este necesară pentru stabilirea agentului sau agenților infectanți și că indicații privind terapia cu seruri specifice. Rezultatul laboratorului, uneori destul de tardiv, face ca terapia cu ser polivalent antigangrenos să fie instituită în orice suspiciune clinică de infecție cu aceste bacterii.

.) Se pune problema numai în tetanosul noului născut, postabortiv sau postoperator, când apar aspecte medico-judiciare.



Bacilii gram-negativi anaerobi fac parte din așa numita floră Veillon (care include toți anaerobii nesporulați), prezentă pe tegument și pe mucoasele intestinală, uro-genitală, bucală și a căilor respiratorii superioare. Bacilii gram-negativ anaerobi reprezintă cea mai importantă componentă a florei normale a acestor mucoase.

În anumite condiții pot determina variate infecții localizate sau generalizate în asociație cu alți anaerobi sau cu variate specii facultativ anaerobe. Se apreciază că acești bacili sînt prezenți în mai mult de jumătate din produsele patologice din care se izolează floră anaerobă.)

Bacilii gram-negativi anaerobi cu interes pentru patologia infecțioasă sînt grupați în 3 genuri

• Bacteroides,

• Fusobacterium,

• Leptotrichia

fiecare gen cuprinzînd numeroase specii.

Frotiul gram din produse patologice poate pune în evidență bacili gram-negativi drepți sau ușor în-

•) Una din speciile cel mai frecvent întîlnite este Bacteroides fragilis.



curbați, cu extremități rotunjite sau efilate, uneori forme filamentoase ce prezintă umflături terminale sau centrale alături de formațiuni sferice libere. Aspectele descrise nu caracterizează în mod deosebit speciile unui anumit gen.

### Cultura

Cultivarea exclusiv în anaerobioză este un test major de identificare a acestor bacterii.

Pe geloză-sînge, în anaerobioză, după 24-48 ore la 37°C formează colonii mici, S, translucide sau semiopace, eventual înconjurate cu o zonă de hemoliză. Bacteroides melaninogenicus apare sub formă de colonii pigmentate în brun-negru, pigmentare care se intensifică prin prelungirea incubării.

Puține specii necesită pentru cultivare medii cu sînge lacat și cu adăus de menadion (vitamina K) sau vitamine din complexul B.

Bacteroides fragilis se dezvoltă mai bine pe medii cu 20% bilă.

Criteriile utilizate în identificarea ca specie a bacililor gram-negativi anaerobi includ pe lîngă aspectele morfo-tinctoriale și de cultură și rezultatele numeroaselor teste biochimice și analiza cromatografică a produsilor rezultați din fermentarea glucozei. Această identificare este deosebit de laborioasă și uneori depășește chiar posibilitățile unor laboratoare cu profil.



Laboratorul de microbiologie clinică își propune numai încadrarea într-un grup sau cel mult gen a bacteriilor izolate. Mult mai importantă este demonstrarea implicării lor etiologice și testarea sensibilității la antibiotice.

Efectuarea antibiogramelor pentru bacilii gram-negativi anaerobi se impune întrucât spectrul de sensibilitate variază chiar de la tulpină la tulpină. De menționat, necesitatea includerii în trusa de testare și a rondelurilor de penicilină, unii din bacilii gram-negativi anaerobi fiind sensibili la acest valoros antibiotic.

Rezistența selectivă a unor specii anaerobe gram-negative față de unele antibiotice (neomicină, kanamicină, vancomicină, paromomicină) este folosită pentru prepararea de medii selective pentru izolare.



Bacilii gram-pozitiv nesporulați anaerobi fac parte din flora Veillon fiind întâlniți pe tegumente și pe mucoase. Speciile cu interes pentru patologia infecțioasă sînt grupate în 3 genuri (tabelul 18), fiecare gen cuprinzînd numeroase specii.

Factori care influențează defavorabil apărarea antiinfecțioasă locală sau generală a organismului fac ca aceste bacterii să-și manifeste potențialul de patogenitate. Incidența lor în variate infecții localizate sau generalizate este însă mai mică comparativ cu a bacililor gram-negativi anaerobi (cca 1/3 din cazuri).

Cel mai frecvent semnalat sînt bacilii înalți în genurile Eubacterium (în orice produs patologic) și Propionibacterium (în general în toate produsele, mai rar în cele care provin din sfera uro-genitală). Urmează apoi reprezentanții genului Actinomyces, A. israelii fiind una din speciile cele mai cunoscute din cauza unei entități clinice pe care o provoacă: actinomicoza cervico-facială.

De menționat este apariția lor posibilă ca contaminanți ai unor produse normal sterile<sup>\*)</sup>.

<sup>\*)</sup> Îndeosebi Propionibacterium acnes, prezent pe tegumente și care poate contamina frecvent hemoculturile în anaerobioză.



### Tabelul 18

Principalele genuri care includ bacili gram-positivi nesporulați anaerobi cu interes pentru patologia infecțioasă.

#### Subgrupe morfologice

#### Genuri

I. Bacili drepti sau ușor incurbați, dispuși izolat, în perechi sau în lanțuri

*Subbacterium*

II. Bacili care pot prezenta ramificații și care sînt agizați în perechi, palisade sau litere unghiulare

*Propionibacterium*.)

*Actinomyces*.)

.) Cuprind specii preferențial anaerobe, unele facultativ anaerobe.

Identificarea ca specie a bacililor gram-positivi nesporulați anaerobi se face pe baza așeloreși grupe de caractere ca și în cazul bacililor gram-negativi anaerobi (vezi capitolul 21) și ea constituie un scop important pentru laboratorul de microbiologie clinică, care trebuie însă să aducă argumentele pentru implicarea etiologică a acestor izolați indiferent de numele pe care îl poartă.

Studiile privind testarea la antibiotice a bacililor gram-positivi nesporulați anaerobi indică sensibilitatea quasiconstantă a acestora față de penicilină, clindamicină, lincomicină și rifampicină.



Pentru clinician este utilă indicarea prezenței în produsul patologic a unor bacili gram-pozitivi nesporulați anaerobi și implicarea lor etiologică; infecțiile cauzate exclusiv de specii din acest grup sînt influențate favorabil de terapia cu penicilină.



21 IDENTIFICAREA BACILILOR ACIDO-ALCOOLO-  
REZISTENTI

Mycobacterium tuberculosis

Mycobacterium bovis

Mycobacterium avium

Mycobacterium leprae

Micobacterii saprofite și  
condiționat patogene

Bacilii acido-alcoolo-rezistenți aparțin genu-  
lui Mycobacterium.

Genul include numeroase specii care pot fi di-  
vizate în 2 mari grupe:

(1) Specii necultivabile pe medii artificiale:  
M. leprae, agentul etiologic al leprei umane.

(2) Specii cultivabile pe medii artificiale,  
cu creștere lentă sau rapidă.

(i) Patogene pentru om și animale cu sânge  
cald:

- M. tuberculosis, agentul etiologic al tuber-  
culozei umane,

- M. bovis, agentul etiologic al tuberculozei  
bovine,

- M. avium, agentul etiologic al tuberculozei  
aviare.

Patogenitatea nu este strictă pentru o anumită  
specie animală, M. bovis și M. avium pot cauza uneori



îmbolnăviri și la om.

(ii) Saprofite ale mediului înconjurător, care se comportă față de om ca accidental sau condiționat patogene: M. kansasii, M. intracellulare, M. scrofulaceum, M. marinum, M. fortuitum ș.a.

Afecțiunile pe care le determină se aseamănă, clinic și radiologic, cu tuberculoza fiind cunoscute sub numele de micobacterioze. Individualizarea acestor afecțiuni este importantă din punct de vedere al conduitei terapeutice.

(iii) Saprofite ale mediului extern, unele prezente pe mucoasele omului și animalelor, nepatogene. Contaminează ocazional probele de urină și suc gastric: M. smegmatis, M. vaccae ș.a.

### Mycobacterium tuberculosis

M. tuberculosis, față de restul micobacteriilor, determină mai mult de 90% din îmbolnăvirile la om. Reprezintă principalul agent etiologic al tuberculozei umane. Cea mai frecventă localizare o constituie pulmonul dar există și variate localizări extrapulmonare: meningita tuberculoasă, tuberculoza renală, genitală, articulară, osoasă, ganglionară, cutanată, intestinală ș.a.

Diagnosticul de tuberculoză pulmonară sau extrapulmonară se face prin punerea în evidență a M. tuberculosis - prin examen microscopic, cultură, sau inoculare la cobai - în produsele recoltate de



la bolnav. Acestea variază în funcție de localizarea procesului tuberculos: spută, spălătură gastrică, lcr, urina, sînge menstrual, lichid articular sau alte epansamente seroase, biopsii, materii fecale.

Protiul colorat Ziehl-Neelsen efectuat din porțiunile purulente ale sputei sau din sedimentul unor produse concentrate prin centrifugare pune în evidență prezența de bacili acido-alcoolo-rezistenți subțiri, drepti sau ușor încurbați, dispuși izolat sau grupați sub forma unor litere ughiulare.

Acido-alcoolo-rezistența este o proprietate tinctorială care diferențiază micobacteriile de restul microorganismelor.

Morfo-tinctorial, între micobacterii nu pot fi făcute diferențieri, indiferent de caracterul lor patogen sau saprofit-oportunist.

Evidențierea de bacili acido-alcoolo-rezistenți în produsele normal sterile atât și în spută echivalează cu desemnarea agentului infectant.

Semnificația prezenței de bacili acido-alcoolo-rezistenți în urină și produsul de spălătură gastrică va fi stabilită numai după identificarea prin cultură a tulpinii izolate.



Cultura se dezvoltă după minimum 14 zile (fiind obligați a o urmări până la 8 săptămâni), în aerobioză, la 37°C, numai pe medii speciale. Pentru izolare, cel mai larg folosit este mediul Löwenstein-Jensen pe care M.tuberculosis cultivă sub forma de colonii R, eugonice, cu aspect conopidiform având o tentă alb-gălbuie.

Izolarea M.tuberculosis din produsele contaminate impune în prealabil eliminarea florei de asociație. Diferitele procedee de decontaminare preconizate se bazează pe rezistența mult mai mare a bacililor acido-alcoolo-rezistenți la acțiunea unor agenți chimici: acizi, baze, detergenți, enzime, unele antibiotice, grație structurii chimice particulare a peretelui celular, deosebit de bogat în lipide.

Procedul de decontaminare folosit la noi în țară utilizează o soluție NaOH 4% care se adaugă în volum egal sau dublu la produsul de cercetat (în funcție de abundența florei de asociație). Se agită amestecul 2-3 minute și apoi se menține la 37°C timp de 30 min. Se neutralizează cu sol.15% fosfat monopotasic, în prezența albastrului de brom-timol până la virarea culorii în galben-verzui.

Cultura ne furnizează date importante privind identificarea tulpinii izolate. În acest scop sînt urmărite:

- aspectul coloniilor: R, S sau R-S, eugonice sau disgonice;
- viteza de creștere: micobacterii cu crește-



re rapidă (primocultura apare înainte de 7 zile) și cu creștere lentă (peste 7 zile);

- pigmentogeneza: tulpini fotocromogene (colonia se pigmentează în galben numai după expunere la lumină), scotocromogene (pigmentul galben-por-tocaliu se dezvoltă la întuneric) și necromogene;
- temperatura de cultivare: 24°C, 32°C, 37°C, 45°C.

### Studierea caracterelor biochimice

Testul Konno pozitiv (producere de acid nicotinic în cantitate mare) permite diferențierea M.tuberculosis de toate celelalte micobacterii.

Studierea altor caractere biochimice care realizează identificarea ca specie a celorlalte micobacterii, prin volumul mare de lucru pe care îl reclamă, rămâne de competența laboratoarelor de referință.

### Patogenitatea pentru animalele de laborator

variază în funcție de numărul și gradul de virulență al bacililor inoculați și de receptivitatea de specie a animalelor inoculate și calea de inoculare.

Inocularea la animal servește pentru 2 scopuri majore: ca metodă de izolare din produse patologice sau ca metodă de identificare (tabelul 20).

Pentru izolare, cel mai utilizat este cobaiul. Receptivitatea deosebită a acestuia la infecția tuberculoasă face ca inocularea sub-cutanată (a pro-



duselor contaminate) sau intra-peritoneal (a produselor normal sterile) să reprezinte metoda cea mai sensibilă de diagnostic bacteriologic.

Produsele provenite din leziunile de tuberculoză extrapulmonară, care sînt cel mai frecvent paucibacilare, vor fi obligatoriu inoculate la cobai.

Animalul moare în 6 săptămîni - 3 luni cu leziuni cazeoase splenice, hepatice și, mai tardiv, pulmonare, eventual cu șancru de inoculare și adenopatie satelită. Frotiurile din leziuni și cultura confirmă diagnosticul.

#### Tabelul 20

Rezultatele inoculării tulpinilor de micobacterii la animalele de laborator în scop de identificare

Specia	Cobai	Iepure	Soarece	Găină
	s.c. 0,1 mg	i.v. 0,01 mg	i.v. 0,01 mg	i.v.1 mg
M.tuberculosis	+) )	-	+	-
M.bovis	+) )	+) )	+	-
M.avium	-	+	+	+
Alte specii	-	-	+ sau -	-

\*) Fac excepție tulpinile HIN rezistente și cele izolate din leziuni lupice.



### Antibiograma

Intrusît tulpini de M.tuberculosis și M.bovis manifestă cu o frecvență sporită rezistență dobândită față de unele tuberculostatice majore, practicarea antibiogramei pentru micobacteria infectantă este obligatorie.

Antibiograma se mai impune și pentru motivul că celelalte specii au în general o rezistență naturală față de streptomycină și HIN și variabilă, în funcție de tulpină, față de restul tuberculostaticelor.

Antibiograma poate servi și în scop de identificare: hidrazida acidului ftiofen- 2 carboxilic și pirazinamida diferențiază M.tuberculosis de M.bovis

Din cauza creșterii lente a majorității micobacteriilor, antibiograma se execută cu antibioticele și chimioterapicele incorporate în mediu în concentrații absolute.

### Mycobacterium leprae

M.leprae, agentul etiologic al leprei umane, se prezintă, în frotiurile din produsele de scarificație tegumentară sau de la nivelul mucoasei septului nazal, sub formă de bacili acido-alcoolo-rezistenți drepți sau ușor încurbați, izolați sau grupați. Deosebit de caracteristică este dispoziția lor paralelă în interiorul mononuclearelor (globi).

Nu cultivă pe medii artificiale. Izolarea din leproame a reușit numai prin inoculare intraplantară la șoarece.



Borrelia *recurrentis*  
*duttoni*  
*sinensis*  
*nocalis*  
*refrigerans*

Borrelia

Treponema

Leptospira

Genul Borrelia

Unele specii sînt patogene pentru om și animale la care determină febrele recurente transmise de păduchi (B.recurrentis ș.a.) sau căpușe (B.duttoni ș.a.)

La bolnav prezența boreliilor este urmărită în sîngele recoltat în cursul acceselor febrile ale bolii.

Frotiul de sînge colorat Giemsa evidențiază microorganisme filamentoase de 10-20  $\mu$  lungime, subțiri cu 5-7 spire largi neregulate.

Examenul plasmei în preparat umed pe fond negru (vezi capitolul 2, p.44) evidențiază în plus mobilitatea germenului (fig.51).

Dacă aceste examene rămîn negative, proba de sînge de la bolnav se inoculează intra-peritoneal la șobolani de 3-5 zile. Probe de sînge din coada animalelor sînt examinate zilnic prin frotiu colorat sau pe fond negru pentru evidențierea boreliilor.



Alte specii sînt comensale oportuniste ale cavității bucale (B.vincenti, B.buccalis) sau genitale (B.refringens). La pacienți cu apărarea antiinfecțioasă deficitară B.vincenti în asociație cu Fusobacterium fusiforme poate determina leziuni ulcero-necrotice: angina Vincent, stomatite.

Protiul gram din exsudatul leziunilor ulcero-necrotice evidențiază numeroase microorganisme filamentoase cu spire largi, neregulate și bacili gram-negativi fuziformi (vezi și capitolul 30, p.309).

### Genul Treponema

Treponemele patogene - Tr.pallidum (agentul etiologic al sifilisului), Tr.pertenue (agentul etiologic al pianului) și Tr.carateum (agentul etiologic al pinteii) - nu cultivă *in vitro* și sînt similare morfologic.

Treponema pallidum este căutată în serozitatea din ganglionul sifilitic și din ganglionii limfatici sateliți acestei leziuni.

Pentru recoltarea probei mîinile sînt protejate cu mănuși chirurgicale de cauciuc. Se spală leziunea cu ser fiziologic steril folosind o compresă de tifon. Dacă există crustă se îndepărtează după înmuierea ei.

Se gratează ușor marginea ganglionului (nu trebu-



ie să sîngereze ) și se exprimă ușor între degete baza șancrului pentru a obține o picătură de serozitate.

Se atinge picătura cu o lamă de microscop, se montează preparatul umed și se examinează la microscopul cu fond negru.

Examenul microscopic pe fond negru al serozității din șancru poate evidenția Tr.pallidum care apare ca un organism filamentos de 6-20  $\mu$  lungime, subțire, cu 6-18 spire adînci, regulate și cu capetele efilate. Mobilă, prezintă grațioase mișcări de flexie și de translație lentă.

În serozitatea șancrelor din regiunea ano-genitală, mai ales la femeie, și a celor bucale, Tr.pallidum trebuie diferențiată de treponemele și boreliile comensale contaminante. Acestea sînt mai lungi și mai groase sau au spire neregulate. Examenul serozității din ganglionii sateliți evită aceste dificultăți: proba nu este contaminată.

Colorarea directă cu anticorpi fluorescenti a frotiurilor din serozitatea leziunilor sifilitice primare poate evidenția de asemenea Tr.pallidum. În acest caz colorarea și examinarea frotiului pot fi temporizate.

### Genul Leptospira

Leptospirele patogene sînt reunite în specia Leptospira interrogans iar cele saprofite în spe-



cia Leptospira biflexa. Există 125 serotipuri de leptospire patogene cuprinse în 18 serogrupe (tabelul 21).

### Tabelul 21

Lista serogrupelor de leptospire (O.M.S., 1967)

1. <i>L.icterohaemorrhagiae</i>	10. <i>L.australis</i>
2. <i>L.javanica</i>	11. <i>L.pomona</i>
3. <i>L.calledoni</i>	12. <i>L.hebdomadis</i>
4. <i>L.canicola</i>	13. <i>L.bataviae</i>
5. <i>L.ballum</i>	14. <i>L.tarassovi</i>
6. <i>L.pyrogenes</i>	15. <i>L.panama</i>
7. <i>L.cynopteri</i>	16. <i>L.shermani</i>
8. <i>L.autumnalis</i>	17. <i>L.semaranga</i>
9. <i>L.grippotyphosa</i>	18. <i>L.andamana</i>

La bolnavul cu leptospiroză leptospirele se urmăresc în sânge în prima săptămână de boală, în urină din a 2-a săptămână de boală, în lor la bolnavii cu reacții meningeale; în ficat, pulmonii, rinichi la cadavre.

Examenul microscopic pe fond negru al preparatului umed (plasmă de la animalele inoculate experimental<sup>\*)</sup>, urină, culturi) evidențiază un microorganism mobil, filamentos, lung de 15-20  $\mu$  și subțire. Spirele sînt puțin adînci, foarte strînse și regulate (aspect de frînghie răsucită) iar extremitățile în cîrlig (fig.51).

<sup>\*)</sup> Pe plasma pacienților cu leptospiroză, acest examen nu dă rezultate satisfăcătoare din cauza arctectelor.



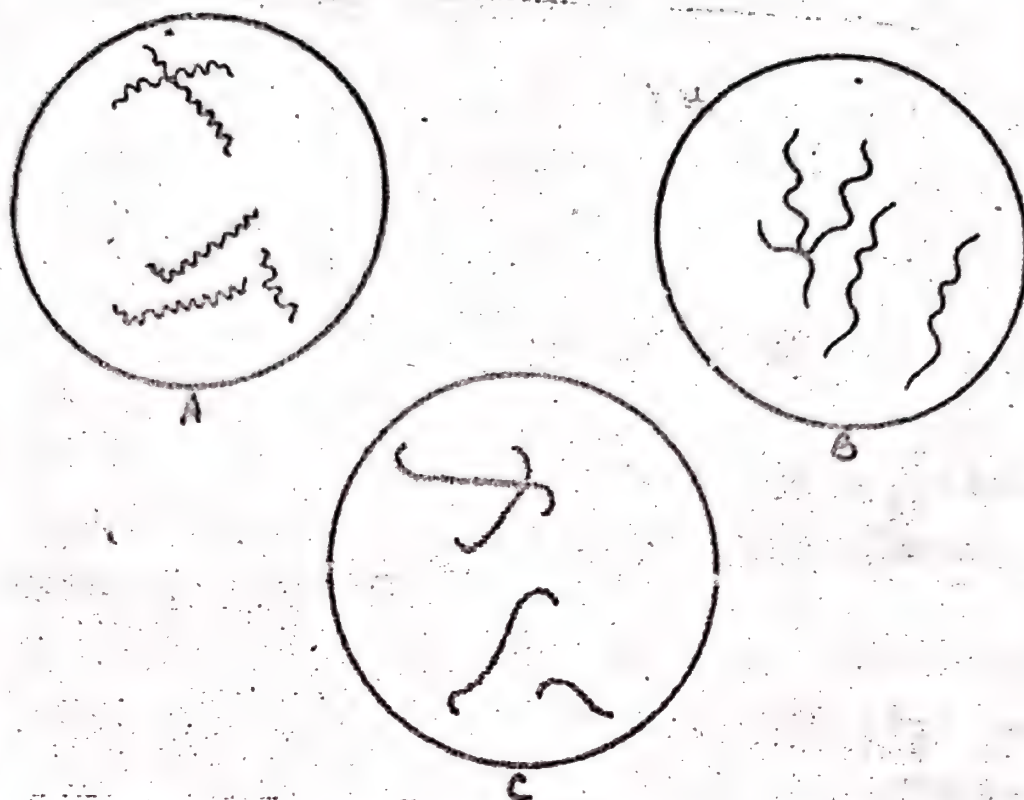


Fig.51 Aspectul microscopic al spirochetelor (schematic): A-Treponema pallidum, B-Borrelia, C-Leptospira.

Morfologic, variatele serotipuri de leptospire patogene nu se diferențiază între ele; nici leptospirele patogene de cele nepatogene.

### Cultura

Leptospirele cultivă în aerobioză la  $28^{\circ}\text{C}$  și întotdeauna în medii care în esență constau dintr-o soluție salină tamponată la pH 7,2-7,4 și îmbogățită cu ser de iepure, peptonă sau infuzie de carne. În aceste condiții, cultura apare în 1-2 săptămâni. Nu este vizibilă cu ochiul liber. Se evidențiază prin examen microscopic pe fond negru al preparatului umed.



Izolarea pe medii de cultură în paralel cu inocularea la cobai sînt principalele metode de evidențiere a leptospirelor la bolnav.

Leptospirele patogene inoculate la cobai determină o boală febrilă.) cu pierdere în greutate.

În cazul leptospirelor foarte virulente incubatia bolii experimentale este de 2-5 zile și către a 4-13-a zi de la inoculare survine moartea animalului precedată, obișnuit, de apariția icterului.

În cazul leptospirelor mai puțin patogene incubatia este mai lungă.

În momentul în care animalele prezintă febră și încep să scadă în greutate sînt sacrificate. Animalele inoculate cu tulpini virulente prezintă seroasele icterice și numeroase hemoragii cutanate, subcutanate și musculare. Ficatul, rinichii și pulmonul sînt congestivi și hemoragici. Leptospirele sînt căutate în sîngele cardiac, exsudatul peritoneal, omogenatele de ficat și splină prin examen microscopic pe fond negru și însămînțare pe medii de cultură.

Identificarea serotipurilor de Leptospira se face prin reacții de aglutinare-liză cu seruri de referință. Reacțiile se fac pe lamă și se citesc în preparat umed la microscopul cu fond negru.

Temperatura normală a cobaiului este de  $38-39,5^{\circ}\text{C}$



## 23 IDENTIFICAREA MICOPLASMELOR

Micoplasmele sînt cele mai mici microorganisme capabile să trăiască pe medii artificiale, deosebindu-se de restul bacteriilor prin absența peretelui celular. Sînt încadrate în genul Mycoplasma, familia Mycoplasmataceae.

Mycoplasma pneumoniae este singura specie potențial patogenă pentru om; alte 5 specii sînt considerate comensale ale mucoasei orale sau genito-urinare (M. orale, M. salivarium, M. hominis, M. fermentans, Mycoplasma T). Unele studii recente atestă potențialul patogen al tulpinilor de M. hominis prin izolarea sa în cultură pură, în cazuri de salpingite acute, din produse recoltate prin laparoscopie.

Examenul microscopic al frotinului din produse patologice nu are nici o valoare din cauza pleomorfismului deosebit de accentuat al acestor microorganisme; formele cocoide au dimensiuni sub puterea de rezoluție a microscopului optic.

Cultura se obține numai pe medii speciale (pe bază de infuzie de inimă de bou) îmbogățite cu 20% ser de cal și 10% extract proaspăt de drojdie; incubarea se face la 37°C timp de 10 zile, pentru M. pneumoniae putîndu-se prelungi, pentru un rezultat definitiv, 30 zile.



Pe medii semisolide aspectul coloniilor este deosebit de tipic. Examineate la microscop, cu obiectiv uscat (din cauza dimensiunilor foarte reduse a coloniilor, între 20-500  $\mu$ ), apar emisferice cu o zonă centrală opacă, granulară, îngropată în grosimea mediului și o zonă periferică translucidă dând coloniei aspectul de „ou prăjit”.

Identificarea speciilor de micoplasme se poate face pe baza caracterelor metabolice. Deosebit de fidele sînt însă testele imunologice, ca testul de inhibare a cultivării prin seruri specifice, testul de imunfluorescență. Aceste teste, fiind mai puțin laborioase, sînt preferate celor metabolice.

./.



24 PRINCIPII DE BAZA IN RECOLTAREA SI  
TRANSPORTUL PROBELOR DESTINATE EXA-  
MENULUI BACTERIOLOGIC SI SEROLOGIC

(A) Alegerea produsului patologic și a momentului pentru recoltarea probelor

- organul sau sistemul în suferință,
- poarta de intrare, căile de răspândire și eliminare a microbului din organism,
- stadiul bolii;
- probele recoltate trebuie să reprezinte realul produs patologic.

(B) Normele de bază pentru recoltarea probelor destinate examenului bacteriologic

- recoltarea produselor se face înaintea instituirii oricărui tratament antibacterian,
- probele trebuie recoltate în cantitate suficientă pentru a permite un examen complet,
- recoltarea probelor se face aseptice,
- probele trimise pentru analize trebuie însoțite de date informative clinice suficiente.

(C) Tehnici pentru recoltarea produselor patologice.

(D) Containere. Transportul și conservarea probelor

- instrumentar și containere, pregătirea și sterilizarea lor,
- refrigerarea probelor, indicații și contraindicații,
- mediile de transport.



Practicianul, clinician sau epidemiolog, trimite spre analiză laboratoarelor de microbiologie și seroimunologie probe provenite de la bolnavi, cadavre, convalescenți, alimente ș.a.

Prin examen microscopic și cultivare, microbiologul atestă dacă un organism sau altul este prezent în proba analizată; dacă anticorpii evidențiați corespund sau nu microbului care a determinat îmbolnăvirea investigată. În funcție de aceste rezultate un diagnostic etiologic este confirmat sau infirmat.

Nereușita evidențierii microorganismului infectant sau amprentei sale imunologice în probele analizate poate fi urmarea unor tehnici de laborator neadecvate, dar frecvent ea are drept cauză erori în tehnica de recoltare și transport a probelor.

Recoltarea și expedierea probelor către laboratoarele de microbiologie și seroimunologie trebuie făcută de către personal special instruit.

Sarcina acestei instruirii revine microbiologului care are și îndatorirea de a semnala deficiențele atunci când apar.



(A) Alegerea produselor patologice și a momentului pentru recoltarea probelor

Numim produse patologice umori, secreții, excreții sau țesuturi modificate din punct de vedere biochimic, citologic și microbiologic ca urmare a stării de boală.

Probele destinate examenului microbiologic pentru diagnosticul etiologic al unei infecții se recoltează din locul și în momentul în care este cel mai verosimil a fi găsit microbul infectant.

Produsele patologice și momentul pentru recoltarea probelor sînt stabilite în funcție de datele clinice și ținînd cont de caracteristicile biologice ale microbului și patogenia infecției suspectate (căi de pătrundere, răspîndire și eliminare din organism a microbului infectant, dinamica anticorpilor ș.a.).

Probele destinate examenului microbiologic se recoltează uzual de la nivelul organului afectat: într-un abces se recoltează puroiul, într-o infecție a căilor aeriene superioare - exsudatul faringian, într-una a căilor respiratorii inferioare - sputa, într-o meningită - lichidul cefalo-rahidian (lor), iar într-o enterită - materiile fecale etc. etc.

În alegerea produsului patologic trebuie să



se țină seama și de poarta de intrare a infecției, căile de răspândire și eliminare a microbului din organism: într-o meningită virală se examinează lcr, sîngele (calea de răspândire a virusului în organism), materiile fecale (intestinul este poarta de intrare și calea de eliminare din organism a enterovirusurilor, agenți etiologici frecvenți ai meningitelor virale); într-o febră enterică se examinează materiile fecale, sîngele, măduva osoasă, urina, bila.

Stadiul bolii influențează în mod hotărîtor posibilitatea izolării microbului infectant dintr-un produs sau altul: Salmonella typhi se izolează mai ușor și mai frecvent din sînge în primele zile de boală, bacilul dizenteric se izolează mai ușor în stadiul acut, diareia al bolii ș.a.

Probele recoltate din diferite produse trebuie să reprezinte realul produs patologic. Sîngele, lcr, urina ș.a. nu ridică probleme din acest punct de vedere: microbul infectant este uniform dispersat în masa produsului.

O atenție deosebită trebuie acordată însă probelor de spută, materii fecale, exsudat faringian. Dacă în loc de spută se trimite laboratorului salivă, dacă din materii fecale se recoltează fragmente la întîmplare, materii fecale de stagnare hipercontaminate, dacă în loc de exsudat faringian se trimite un tampon îmbibat cu salivă, un răspuns util din partea laboratorului este imposibil



Din acest punct de vedere instruirea personalului nu este suficientă. Trebuie instruiți foarte bine și bolnavii pentru a se asigura cooperarea lor în recoltarea unor produse, cum este cazul sputei (vezi capitolul 31, p. 315).

Probele destinate examenului serologic trebuie să aducă dovada apariției anticorpilor sau creșterii titrului lor în cursul bolii. Se recoltează 2 probe de sânge: una precocă (în momentul depistării sau internării bolnavului în spital) și una tardivă (după 7-14 zile de la prima recoltă).

(B) Normele de bază pentru recoltarea probelor destinate examenului bacteriologic.

(1) Recoltarea produselor se face înaintea instituirii oricărui tratament antimicrobian.

Izolarea bacteriei infectante dintr-o probă de lor purulent devine imposibilă după 24 ore de antibioterapie. În salmoneloze coproculturile sînt negative pe parcursul administrării de antibiotice, pentru a se pozitiva frecvent după sistarea antibioticului.

În cazuri excepționale, cînd această precauție nu a fost respectată, se va informa laboratorul pentru a lua măsurile necesare: penicilina se

.) Date privind produsele destinate examenelor virusologice și parazitologice se vor da la lucrările practice de virusologie și parazitologie.



poate neutraliza prin penicilinază, sulfamidele prin acid para aminobenzoic; pentru restul antibioticelor, și numai în cazul produselor normal sterile, se poate tenta diluarea probei într-un volum mare de bulion.

Oricît de gravă ar fi o infecție și oricît de mare ar fi urgența terapiei antimicrobiene, întotdeauna se pot găsi cîteva minute, înaintea administrării primei doze de antibiotic, pentru recoltarea produselor patologice în vederea examenului bacteriologic corect.

(2) Probele trebuie recoltate în cantitate suficientă pentru a permite un examen complet.

(3) Recoltarea probelor se face aseptice.

Trebuie prevenite

- contaminarea probelor în cursul recoltării și transportului;

- orice posibilitate de infectare a bolnavului în cursul recoltării probei (puncții, cateterisme ș.a.) și a personalului de salon (soră, infirmieră) și de laborator în cursul transportului și prelucrării probelor.

Probele recoltate se introduc în containere sterile care previn orice contaminare a mediului, a bolnavilor, a personalului de salon și a celui de laborator. Foarte periculoasă din acest punct de vedere este murdărirea suprafeței externe a containerelor cu spută și materii fecale. Nici sîngele



și nici celelalte umori ale organismului nu sînt inofensive, chiar atunci cînd provin de la bolnavi fără infecții aparente sau nu sînt destinate examenului microbiologic (pericolul transmiterii virusului hepatitei).

Pentru prevenirea acestor contaminări este necesară educarea permanentă și controlul vigilent al personalului în subordine.

(4) Probele trimise spre analiză trebuie însoțite de date informative clinice suficiente.

Aceste date sînt cuprinse în buletinul de analiză tip al unității medicale. Semnificația și importanța acestor date se pot grupa după cum urmează:

(i) Date necesare pentru identificarea produsului: numele și prenumele, vîrsta bolnavului, spitalul, clinica/secția, salonul.

(ii) Date necesare evitării unor rezultate eronate prin prelucrarea unor probe necorespunzătoare recoltate sau degradate în timpul transportului-conservării: data și ora efectuării recoltei, expedierii și primirii în laborator, condițiile de transport și conservare, persoana care a făcut recolta, care a asigurat transportul și a recepționat produsul la laborator.

(iii) Date necesare pentru alegerea tehnicilor cele mai adecvate de prelucrare a probei: diagnosticul prezumptiv, natura probei, examenul solicitat (în termeni cît mai preciși), precizarea dacă este



vorba de bolnav (în acest caz se va preciza și data debutului bolii), convalescent sau purtător, precizări asupra antibiterapiei eventuale.

### (C) Tehnici pentru recoltarea produselor patologice

Tehnicile pentru recoltarea produselor patologice destinate examenului bacteriologic variază de la produs la produs. Vor fi expuse în detaliu la fiecare capitol destinat examenului bacteriologic al principalelor categorii de produse patologice.

#### Tehnica recoltării sîngelui pentru examene serologice

Se recoltează 2 prize de ser (vezi p. 99).

##### Material necesar:

- seringă de 10 cc cu ac pentru puncții venoase, sterilizată prin autoclavare sau fierbere;
- eprubete sterile de 16/160 mm sterilizate la autoclav;
- ser fiziologic steril;
- garou, alcool, vată.

Recoltarea se face prin punționarea unei vene ușor abordabile (de obicei venele de la plica cotului, iar la sugari jugulara).

Se clătește cu ser fiziologic steril sticlăria utilizată pentru recoltare (seringă, eprubetă).

Se aplică garoul, se antiseptizează plica cotului, se punționează vena și se extrage o cantitate



de 5-10 ml sînge. Se dă drumul la garou și se re-  
trage acul; se fricționează locul puncției cu tam-  
ponul îmbibat cu alcool.

Recoltele se fac cu ac și cu seringă separată  
pentru fiecare bolnav în parte. Este interzisă u-  
tilizarea aceleiași seringi la mai mulți pacienți,  
chiar dacă se schimbă acul.

Se introduce sîngele în eprubetă.

Pentru separarea serului sîngele este lăsat să  
coaguleze la temperatura camerei în eprubeta dispu-  
să pe un plan înclinat. După coagularea sîngelui,  
eprubetele sînt menținute 1-2 ore la 37°C, pentru  
a grăbi retractarea cheagului. După aceasta, se  
desprinde cheagul de pe pereții eprubetei cu ajuto-  
rul unei pipete Pasteur închisă la vîrf, iar epru-  
betele se introduc la frigider la 4°C unde se men-  
țin pînă a doua zi cînd serul este decantat steril.

Pînă la efectuarea reacțiilor, serul se păs-  
trează la 4°C iar dacă durata de conservare depă-  
șește cîteva zile va fi menținut congelat la -25°C  
(în vederea congelării: dacă după decantarea de pe  
cheag au rămas hematii în suspensie, serul se va  
redecanta).

Serul destinat examenelor serologice trebuie  
să fie steril și nehemolizat.

Serurile infectate și hemolizate dau reacții  
fals pozitive.



(D) Containere, Transportul și conservarea probelor

După eliminarea din organism șansele de supraviețuire și multiplicare a micro-organismelor patogene cresc cu atât mai mult cu cât sînt însemîntate mai repede pe medii de cultură adecvate.

Moartea microorganismelor infectante din probele destinate examenului microbiologic poate fi cauzată de:

- agenți inhibitori de pe instrumentarul și containerele utilizate,
- razele solare directe,
- deshidratare,
- modificări de pH,
- oxidare,
- autoliză,
- multiplicarea contaminanților normali ai unor produse,
- oxigenul atmosferic în cazul anaerobilor stricti.

În principal, din acest punct de vedere, al conservării viabilității bacteriilor infectante, vom privi problema instrumentarului, containerelor și a transportului probelor.

Pentru recoltarea probelor se pot folosi cutii Petri, eprubete, flacoane de sticlă, cu gura largă, de diferite capacități, borceane de sticlă cu capac. În vederea utilizării, toate aceste recipiente trebuie să fie foarte bine spălate.



Atît instrumentarul cît și containerele destinate recoltării probelor pentru examene microbiologice se sterilizează exclusiv prin agenți fizici (căldură uscată, vaporii sub presiune). Este formal contraindicată utilizarea agenților chimici: urme din aceste substanțe sînt nocive pentru microorganisme.

Un instrument foarte des utilizat pentru recoltarea și transportul probelor este tamponul de vată (recoltarea exsudatelor faringiene, bucale, nazale, nazofaringiene, conjunctivale, otice, genitale, puroi din supurații ș.a.)

Tamponul se compune din aplicator și tamponul propriu-zis (fig. 52). Ambele componente trebuie să



Fig.52 Tamponul pentru recoltarea unor probe destinate examenului microbiologic

să fie lipsite de inhibitori bacterieni. Aceștia pot fi ioni metalici și acizi grași din vată. De aceea la confecționarea tamponanelor

- se preferă aplicatorul de lemn, oelul de aluminu sau nichel-crom,

- se tratează vata pentru îndepărtarea inhibitorilor sau pur și simplu se înlocuiește cu alginat de calciu sau cu fibră poliesterică.



Pentru îndepărtarea inhibitorilor din tampoanele de vată<sup>\*)</sup> acestea, după confecționare, sînt imersate în soluție tampon Sørensen pH 7,2 la fierbere, uscate la 37°C, introduse în tuburi de sticlă prevăzute cu dop de vată (fig.52) și sterilizate la autoclav. Dopul trebuie să fie dens, să astupe bine, pentru a evita uscarea rapidă a produsului.

Probele destinate izolării anaerobilor stricți sînt introduse în flacoane ermetic închise sub atmosferă de azot.

Odată recoltate, probele trebuie transportate la laborator în cel mai scurt timp posibil. Sansele de izolare a bacilului dizenteric din materii fecale scad proporțional cu intervalul de menținere a probelor pe masă (în salon, în laborator). Această bacterie relativ fragilă este distrusă în condițiile antagonismului exercitat de flora de contaminare normală a probei, care continuă a se multiplica la temperatura camerei. Se pot da nenumărate exemple în acest sens.

---

<sup>\*)</sup> Tampoanele utilizate curent în serviciile noastre sînt tampoane de vată.

Modul de confecționare a tampoanelor destinate recoltării diferitelor produse (dimensiune, formă ș.a.) va fi tratat la capitolele respective.



Refrigerarea probelor este utilă atunci cînd intervalul recoltare-testare se prelungește. Majoritatea bacteriilor patogene supraviețuiesc foarte bine la temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$  iar multiplicarea contaminanților normali este oprită sau mult încetinită.

Bacteriile care nu rezistă la refrigerare sînt puține: meningococul, gonococul, Haemophilus influenzae. Deoarece meningococul și gonococul mor repede chiar la temperatura camerei, înșămîntarea produselor din care se așteaptă izolarea acestor bacterii trebuie făcută direct la patul bolnavului în medii preîncălzite la  $37^{\circ}\text{C}$  sau transportul acestor produse trebuie făcut foarte repede la  $37^{\circ}\text{C}$ . Sînt situații care necesită o înțelegere prealabilă între clinician și laborator.

Mediile de transport asigură o bună supraviețuire a bacteriilor patogene prin menținerea unui pH favorabil, prevenirea dehidratării, oxidării și autolizei enzimatică. Adăugarea la aceste medii a unor substanțe antimicrobiene cu acțiune strict specifică le poate face foarte utile pentru transportul probelor cu floră de contaminare normală (materii fecale ș.a.) Recomandăm ca mediu de transport mediul Stuart (pentru gonococ, patogenii din exsudatul faringian și microbii sensibili la oxigen) și mediul Cary-Blair sau soluția glicerinată, salină, tamponată a lui Sachs (pentru materii fecale).



Pentru a asigura standardizarea condițiilor de recoltare și un schimb util de informații între laborator și clinică, laboratorul este cel care distribuie materialul gata pregătit pentru recoltare (containere, tampeane, medii de transport, medii pentru hemo culturi etc.).

./.



MODEL DE BULETIN DE ANALIZA BACTERIOLOGICA SAU  
SEROLOGICA

SPITALUL.....  
Clinica/Secția.....  
Salonul.....

Numele..... Prenumele..... Vîrsta.....

Diagnosticul prezumtiv:.....

Data îmbolnăvirii.....

Proba de cercetat.....

Vaccinări în antecedente.....

Antibioterapie înaintea recoltării probei: drogul

administrat (doza și ora ultimei administrări,

calea de administrare).....

Examenul solicitat (termeni preciși).....

.....

Data recoltării.....ora....de către.....

Expediat în ziua de....ora....prin.....

Conservat: la.....de la ora.....la ora.....

Primit în laborator în ziua de....ora.....

de către.....

Condițiile în care a ajuns la laborator:

Starea recipientului.....

.....

Rezultatul analizei.....

.....

.....

.....

Antibiograma.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Semnătura.....

PRODUSELE NECORESPUNZATOR RECOLTATE SI EXPEDiate  
Sînt REFUZATE DE LABORATORUL DE MICROBIOLOGIE SI  
SEROLOGIE !



25 EXAMENELE BACTERIOLOGIC SI SEROIMUNOLOGIC  
IN BOLILE INFECTIOASE

Examenele de laborator furnizează clinicii  
- diagnosticul etiologic al infecției și  
- indicații privind antibioticele eventual ac-  
tive asupra microbului infectant.

Pentru stabilirea diagnosticului etiologic al  
unei boli infecțioase laboratorul recurge la 2 cate-  
gorii de examene:

(A) - evidențierea și identificarea microbului  
infectant: diagnostic microbiologic sau direct și

(B) - evidențierea anticorpilor (umoralii sau  
celulari) apăruiți în cursul bolii: diagnostic sero-  
imunologic sau indirect.

Metodele de laborator furnizează tot o dată  
epidemiologului diagnosticul etiologic al epidemiei,  
deci datele pentru instituirea măsurilor raționale  
de profilaxie și combatere a ei.

Diagnosticul bacteriologic, comparativ cu cel  
imunologic, prezintă două mari avantaje

(-) stabilește precoce microbul infectant (nu es-  
te legat de intervalul necesar apariției anticorpi-  
lor) permițând instituirea în timp util a tratamen-  
tului etiologic;

- permite efectuarea antibiogramei atât de im-  
portantă pentru terapia rațională în infecții bacte-



riene.

## Diagnosticul etiologic al bolilor infecțioase

### (A) Diagnosticul bacteriologic (direct)

- (1) Examenul direct macroscopic
  - (2) Examenul direct microscopic
  - (3) Izolarea
  - (4) Identificarea
- Criterii de implicare etiologică a bacteriilor izolate  
Antibiograma

### (B) Diagnosticul seroimunologic (indirect)

- (1) Teste *i n v i t r o*
- (2) Teste *i n v i v o* - intradermo-reacții

### (A) Examenul bacteriologic (direct)

Probele sînt prelucrate în etape succesive care conduc la izolarea și identificarea bacteriei infectante.

(1) Examenul direct macroscopic al probei permite să se aleagă, din unele produse patologice, pentru examinarea ulterioară, fragmente caracteristice în care există șanse crescute de a evidenția microbul infectant. Etapa este importantă în special pentru spută (din care se aleg fragmentele muco-purulente), materii fecale (din care se aleg fragmentele muco-sangvinolente, muco-purulente, granulații riziforme) ș.a.



## (2) Examenul direct microscopic

Examenul frotiului colorat. Obişnuit, din probă se efectuează un frotiu colorat Gram şi unul colorat cu albastru de metilen sau Giemsa. Suspiciunea de infecţie tuberculoasă impune efectuarea şi a unui frotiu colorat Ziehl-Neelsen.

În puţine împrejurări examenul preparatului umed furnizează date utile.

Pe frotiul colorat Gram se urmăresc prezenţa, numărul, morfologia şi afinitatea tinctorială a bacteriilor.

Pe frotiul colorat cu albastru de metilen (sau Giemsa) se urmăresc prezenţa şi tipul reacţiei celulare, prezenţa, numărul şi morfologia bacteriilor.

Se examinează între lamă şi lamelă la microscopul cu fond negru: plasma pentru a evidenţia Borrelia recurrentis la suspectii de febră recurentă şi exsudatul din şnurul tare pentru a evidenţia Treponema pallidum.

Evidenţierea pe frotiu a unor bacterii cu morfologie şi afinitate tinctorială caracteristice, în produse în care în mod normal nu se evidenţiază asemenea bacterii poate preciza diagnosticul infecţiei încă din etapa examenului direct microscopic. De exemplu, diagnosticul febrei recurente, a sifilisului primar, a unei meningite pneumococice, a uretritei gonococice acute ş.a. Pentru bacteriile



fără rezistență dobândită la antibiotice, diagnosticul astfel stabilit este suficient.

Pe frotiu nu se poate examina decât o fracțiune infimă din probă. De aceea, lipsa unui microb la examenul direct microscopic nu semnifică în mod necesar și lipsa acestuia din proba examinată.

Dacă examenul direct microscopic permite numai în puține cazuri stabilirea unui diagnostic definitiv, el furnizează în cel mai scurt timp (minute) date orientative utile

- clinicianului pentru stabilirea antibioterapiei de urgență (de exemplu într-o meningită) (a se revedea clasificarea antibioticelor după spectrul de acțiune; de făcut corelația între morfologia, afinitatea tinctorială a bacteriilor și sensibilitatea lor naturală la antibiotice; de corelat frecvența rezistenței dobândite la un antibiotic cu frecvența utilizării acestuia într-o regiune dată; antibiotice de rezervă);

- microbiologului pentru alegerea metodei de izolare.

### (3) Izolarea

Izolarea are de scop obținerea în cultură pură a bacteriei infectante. Obişnuit, se realizează *in vitro* pe medii de cultură. Mai rar, izolarea se face *in vivo* prin inoculare la ani-



male sensibile selectiv pentru o anumită bacterie.

(a) Izolarea pe medii de cultură

Alegerea mediului de cultură și a condițiilor de incubare sînt dictate de tipul de produs patologic, de datele clinice și de datele examenului direct.

Din punct de vedere bacteriologic, produsele patologice se împart în 3 mari categorii:

(i) Produse normal necontaminate (conțin exclusiv microbul infectant): sînge, exsudate din cavitățile seroaselor, lor, puroi din colecții închise, biopsii.

Recoltarea probei și însămînțarea acestui tip de produse în condiții corecte de asepsie permite obținerea *p e r p r i m a m* a culturii pure prin utilizarea, după caz, a mediilor lichide sau a mediilor solide.

Medii solide. Pentru izolare, datorită spectrului larg de posibilități pe care le oferă, se folosește de obicei geloza-sînge, dacă nu există indicații speciale pentru folosirea unui alt mediu îmbogățit.

Medii lichide. Dacă numărul microbilor viabili din probă este foarte redus - cazul sîngelui întotdeauna, chiar în septicemii grave - izolarea pe medii solide este imposibilă. În asemenea cazuri se recurge la izolarea lor pe medii lichide în care se poate însămînța un volum mai mare de produs.



Cel mai utilizat este bulionul glucozat. De la caz la caz, se poate recurge și la alte medii speciale.

Însămînțarea pe medii lichide impune cele mai riguroase condiții de asepsie la recoltarea și însămînțarea probelor deoarece contaminarea, chiar minimă, cu un saprofit de pe tegumente sau din aer, denaturează rezultatele examenului.

(ii) Produse normal necontaminate, care se contaminatează în timpul eliminării din organism: urina (contaminată cu flora uretrei distale), sputa (contaminată cu flora buco-faringiană).

(iii) Produse din zone normal contaminate: exsudat faringian, vaginal, materii fecale ș.a.

Izolarea bacteriilor din aceste 2 categorii de produse contaminate se face exclusiv pe medii solide. Prealabil însămînțării se procedează la metode de reducere a microbilor de contaminare.

Exemple:

Metode de îndepărtare a florei de contaminare

- în cazul recoltării urinei: toaletă cu apă și săpun a mucoasei și tegumentelor periuretrale și recoltarea probei din jetul mijlociu;

4 spălarea fragmentelor muco-purulente din spută în 3-4 băi succesive de ser fiziologic steril prealabil însămînțării;

Metode de inhibare a dezvoltării bacteriilor de contaminare

Pentru izolarea bacteriilor patogene din aceste produse se recurge la medii selective.



În eventualitatea unui număr redus de bacterii patogene se recurge la însemănțarea și incubarea prealabilă a probei într-un mediu de îmbogățire (cu această ocazie se schimbă raportul numeric al bacteriilor din probă în favoarea celor patogene). Mediile de îmbogățire sînt medii lichide; incubarea probei în aceste medii constituie numai o etapă premergătoare izolării.

#### Metode de distrugere a bacteriilor de contaminare

De exemplu, distrugerea bacteriilor neacido-rezistente în scopul izolării bacilului tuberculozei.

(b) Izolarea i n v i v o prin inoculare la animale de laborator specifice sensibile.

Inocularea animalelor se face intra-peritoneal cu produsele normal necontaminate și subcutan cu produsele normal contaminate.

De la animalul astfel infectat experimental, bacteria va fi izolată prin hemocultură și poate fi evidențiată microscopic în sînge sau organe (splină, ficat, rinichi ș.a.)

Această metodă de izolare, deosebit de sensibilă, se utilizează pentru izolarea pneumococului și a bacilului Friedländer din spută, a bacilului tuberculozei din produse paucibacilare, a leptospirelor, a cocabacilului tularemiei.

Izolarea prin inoculare la animal constituie



adesea și metodă de identificare.

(4) Identificarea bacteriilor izolate (vezi capitolele 10-23)

Criterii de implicare etiologică a bacteriei sau bacteriilor izolate

Implicarea etiologică a unei bacterii se apreciază în funcție de produsul din care este izolată și de caracterele sale de patogenitate (patogenă, potențial patogenă etc.)

(i) Cazul produselor normal necontaminate

Însăși izolarea în cultură pură, pe medii solide sau lichide, a unei bacterii patogene este criteriul de implicare etiologică (de exemplu, izolarea din sânge a bacilului tific).

Pentru bacteriile condiționat patogene, mai ales cele ubiquitare la nivelul tegumentelor (Staphylococcus epidermidis ș.a.) trebuie aduse dovezi suplimentare pentru a elimina posibilitatea contaminării probei în cursul recoltării:

- izolarea repetată, în condițiile respectării unei asepsii stricte, a aceleiași bacterii (serotip, biotip ș.a.),

- evidențierea unei bacterii cu aceleași caractere morfo-tinctoriale la examenul direct,

- contextul clinic.

De exemplu: izolarea repetată în 2-3 hemocui-



turi a S.epidermidis la un bolnav cu endocardită subacută atestă implicarea etiologică a acestei bacterii.

(ii) Cazul produselor contaminate cu flora traiectelor de eliminare

Pentru bacteriile patogene, absente normal în flora de contaminare a acestor produse, însăși izolarea - indiferent de cantitatea în care se află prezente - este criteriul de implicare etiologică. De exemplu, izolarea bacilului tuberculozei din spută sau urină semnifică existența unei tuberculoze pulmonare, respectiv renale.

Incriminarea etiologică a bacteriilor condiționat patogene, care contaminează normal aceste produse, se face pe baza criteriului cantitativ: bacteria infectantă multiplicată la nivelul leziunii (mucoasa urinară și urină, mucoasa și secrețiile bronșice) este prezentă în produs în cantitate mai mare decât bacteriile de contaminare normală. Criteriul cantitativ este operant dacă s-au luat precauții speciale de reducere a contaminanților în timpul recoltării produsului (recoltarea urinei din jet mijlociu după toaleta organelor genitale ș.a.) sau a prelucrării lui (spălarea în băi succesive cu ser fiziologic steril a filamentelor mucopurulente din spută) și s-a prevenit multiplicarea lor în intervalul recoltare-examinare.

(iii) Cazul produselor din zone normal contaminate. Identificarea florei bacteriene integrale a a-



cestor produse este inutilă. Se recurge la cercetarea principalelor bacterii patogene în funcție de sindromul clinic.

Absența din probă a unei bacterii patogene care să explice simptomatologia clinică obligă la investigarea rolului etiologic al unora dintre bacteriile condiționat patogene izolate sau al unor virusuri, micete ș.a. Implicarea etiologică a bacteriilor condiționat patogene izolate în asemenea situații se poate face pe baza

- criteriului cantitativ: bacteria condiționat patogenă infectantă ajunge predominantă sau practic exclusivă în produs. De exemplu, stafilococul auriu coagulazopozitiv în probele de materii fecale de la bolnavi cu enterocolită stafilococică consecutivă tratamentului cu antibiotice cu spectru larg.

- Testele de patogenitate, in vitro sau in vivo, sînt de multe ori utile. De exemplu, evidențierea unei tulpini enteropatogene de Escherichia coli în fecalele unui sugar cu diaree sau cercetarea și evidențierea in vivo a producerii de enterotoxină de către o tulpină de Esch.coli izolată de la un bolnav diareic la care nu a putut fi incriminat etiologic altul din izolați.

- Autoserodiagnosticul poate tranșa cazurile în care interpretarea pe baza celorlalte criterii este dificilă. Se cercetează apariția sau creșterea



titrului anticorpilor în cursul infecției față de tulpina suspicionată ca infectantă.

### Testarea sensibilității la antibiotice

În infecțiile cu bacterii al căror spectru natural de sensibilitate a rămas constant pentru unele antibiotice (de exemplu, sensibilitatea streptococului  $\beta$ -hemolitic grup A, treponemei sifilisului ș.a. pentru penicilină) stabilirea diagnosticului etiologic permite implicit și stabilirea antibioterapiei.

Cu totul alta este situația în infecțiile determinate de bacterii care prezintă frecvent tulpini cu rezistență dobândită la antibiotice (stafilococul, bacilul piocianic, Enterobacteriaceae ș.a.) În aceste cazuri antibiograma oferă singura posibilitate de însuțuire a antibioterapiei raționale.

Pentru clinician este mai utilă antibiograma primită a doua zi decît o identificare completă a bacteriei infectante obținută după zile sau săptămîni.

Bineînțeles, antibiograma se va efectua numai pentru bacteria infectantă, apreciată ca atare conform criteriilor tocmai enumerate.



Este ilogic și periculos pentru bolnav de a efectua antibiograma pe orice bacterie izolată dintr-un produs patologic (mai ales din cele cu floră de contaminare normală) înainte de a aduce dovada că este bacteria infectantă.

Antibiogramă pe cultură primară (ACP) și antibiogramă pe cultură secundară (ACS)

Laboratorul își îndeplinește rolul în măsura în care furnizează clinicianului în cel mai scurt timp informații privind comportamentul actual și virtual al populației bacteriene infectante față de o sumă de antibiotice judicioase.

ACP evidențiază, atunci când este posibil de efectuat (vezi capitolul 8, p. 123), comportamentul față de antibiotice a unui eșantion de zeci de sute de mii de bacterii din populația infectantă detectând proporția reală a variantelor rezistente selecționabile pe parcursul antibioterapiei. În plus, evită apariția falselor sensibilități prin eventuala pierdere a FR în subculturi.

Aceste performanțe nu pot fi realizate de ACS, în ciuda posibilităților de standardizare mai riguroasă a metodei, pentru simplul motiv că în ACS testarea se face pentru descendenții numai a câtorva bacterii (maximum 10) din populația infectantă. Oricum, atunci când sîntem obligați să recurgem la ACS, aceasta trebuie făcută realmente pe cultură secundară

\*) Prin comportament actual față de antibiotice al populației bacteriene infectante înțelegem sensibilitatea sau rezistența ansamblului populației bacteriene infectante în momentul izolării.

Prin comportament virtual înțelegem comportamentul față de antibiotice a populației bacteriene infectante pe parcursul antibioterapiei, comportament condiționat de existența și proporția variantelor antibiorezistente selecționabile.



și nu pe culturi terțiare ș.a. pentru că odată cu creșterea numărului de pasaje crește și riscul segregării factorului R.

În fine, al doilea motiv pentru care ACP trebuie să fie practică, atunci când este posibil, rezidă în rapiditatea cu care pune la dispoziție rezultatele: 18-24 ore de la începutul examinării produsului patologic.

### (B) Diagnosticul seroimunologic (indirect)

Diagnosticul indirect se practică

(i) în infecții în care agentul etiologic nu poate fi izolat, fie din cauză că se află cantonat în focare inabordabile pentru prelevarea produsului (sifilis latent, bruceloză), fie pentru că nu poate fi cultivat (infecția sifilitică);

(ii) în toate cazurile în care nu a fost posibilă izolarea agentului etiologic (investigarea bolnavului după dispariția bacteriei infectante din produse patologice abordabile etc.);

(iii) pentru precizarea diagnosticului în unele infecții cu bacterii condiționat patogene (auto-serodiagnostic).

Pentru evidențierea anticorpilor la bolnav (vezi capitolul 7) se recurge la

- teste *i n v i t r o* : diagnosticul serologic și la

- teste *i n v i v o* : teste intradermice pentru evidențierea sensibilizărilor de tip întârziat sau teste intradermice de neutralizare.



Bacteriemia și septicemia  
Bacterii care se izolează în hemocultură  
Când este indicată hemocultura?  
Momentul și numărul recoltelor  
Recoltarea  
Însămânțarea  
Urmărirea și  
Interpretarea hemoculturii

Sângele normal este steril.

În unele infecții în curentul sangvin pătrund bacterii realizând o bacteriemie sau o septicemie. Bacteriemia se caracterizează prin prezența tranzitorie a unei bacterii în sânge ca urmare a cărcării bacteriene, limitată în timp, de la nivelul unui focar infecțios sau a unei mucoase lezate. Starea bacteriemică poate fi lipsită de expresie clinică sau cel mult se însoțește de slăbiciune și febră.

Septicemia este o infecție generală determinată de însembrări masive, continue sau recurente, în sânge a bacteriilor dintr-un focar infecțios inițial.

Prezența în curentul circulator a bacteriilor care se multiplică activ, a toxinelor lor și a produselor de dezintegrare celulară se traduce clinic prin sindromul septicemic - [frisoane, febră, prostratie, erupții cutanate] - care lasă pe al doilea plan simptomatologia focarului infecțios inițial. În septic



mia netratată mortalitatea este foarte mare, tendința la vindecare spontană este o excepție.

Diagnosticul septicemiei și bacteriemiei se stabilește prin hemocultură.

Bacteriile care se izolează în hemoculturi, în ordinea frecvenței actuale, sînt:

Stafilococi coagulazo-pozitivi,  
Bacili gram-negativi intestinali,  
(Escherichia, Klebsiella,  
Serratia, Proteus),  
Streptococi  $\alpha$  și  $\beta$ -hemolitici,  
Pneumococi,  
Enterococi,  
Haemophilus influenzae,  
Clostridium perfringens,  
Pseudomonas aeruginosa,  
Anaerobi nesporulați,  
Neisseria meningitidis,  
Specii de Salmonella,  
Stafilococi coagulazo-negativi,  
Listeria monocytogenes,  
Specii de Brucella,  
Leptospira

Cînd este indicată hemocultura ?

1. La pacienții cu sindrom septicemic.
2. La pacienții suspecți de infecții bacteriene sistemice specifice (febră tifoidă, bruce-loză, pestă, tularemie, morvă).
3. La pacienții cu endocardite bacteriene suba-cute.
4. În evoluția unor infecții bacteriemice deter-



minate de bacterii condiționat patogene: pneumonii, meningite, peritonite, infecții puerperale, infecții ale plăgilor și arsurilor, osteomielite, infecții ale căilor urinare, infecții ale căilor biliare ș.a.

5. La pacienții cu sindroame febrile fără cauză precizată.

6. Hemocultura se mai poate impune în condiții bacteriemice cum sînt: intervențiile operatorii în focare infecțioase cronice (instrumentația căilor urinare ș.a.), la pacienți cu cateterism venos prelungit, la pacienți debilitați tratați cu imunosupresive sau/și prelungit cu antibiotice.

#### Momentul și numărul recoltelor

O singură hemocultură, chiar de la un bolnav cu septicemie, poate să rămână negativă. De aceea, la fiecare pacient cu indicație pentru hemocultură trebuie efectuate cel puțin 3-4 hemoculturi.

Hemoculturile trebuie efectuate înaintea administrării oricărei terapii antimicrobiene.

Concentrații sanguine de antibiotic insuficiente pentru a asigura distrugerea bacteriei și în plus pot împiedica izolarea ei în hemocultură.

Cînd terapia antimicrobiană este o urgență  
sindrom septicemic, șoc postoperator fără cauză evidentă după intervenții pe căile genito-urinare



ș.a., meningite bacteriene, infecții puerperale și alte infecții tisulare rapid extensive - se efectuează, înainte de administrarea primei doze de antibiotic, minimum 3 hemoculturi la intervale de 1/2 oră.

La pacienții cu endocardită subacută cele 2-4 hemoculturi necesare se pot efectua în intervalul de 24-48 ore cît se poate temporiza terapia antimicrobiană.

Frisonul și febra apar după cea 1-2 ore de la pătrunderea bacteriilor în sînge.

De aceea, ori de cîte ori este posibilă temporizarea antibioterapiei (endocardite bacteriene subacute etc.) hemoculturile se vor efectua înainte apariției unui cîroșet febril previzibil.

Este de dorit ca hemoculturile să se practice imediat ce frisonul și febra și-au făcut apariția la pacienți cu infecții ale căilor urinare sau biliare, cu plăgi sau arsuri infectate, cu cateterizare venoasă prelungită, instrumentații ale căilor urinare ș.a.

Intr-o serie de infecții bacteriene cum sînt pneumonia pneumococică, febra tifoidă, tularemia ș.a. procentul hemoculturilor pozitive este mai mare în primele zile de boală și scade progresiv pînă la anulare în următoarele zile.

În infecții cronice, cum este bruceloza, șansa



unei hemoculturi pozitive crește în cursul perioadelor febrile și de exacerbare a simptomatologiei.

Recoltarea probelor de sînge pentru hemocultură se face în condiții de riguroasă asepsie.

#### Material necesar

- seringă sterilă de 20 ml, de preferat tip Luer pentru a fi sterilizată gata montată,
- materiale pentru decontaminarea tegumentului: săpun lichid, alcool iodat 2% sau spirt medicinal, eter, tamponare de vată, pensă,
- garou,
- flacăără,
- medii de cultură.

Persoana care efectuează hemocultura trebuie să fie conștientă de precauțiile pe care trebuie să le ia pentru a evita orice posibilitate de contaminare în timpul recoltării sau a însemnării sîngelui.

Pătrunderea unei singure bacterii saprofite într-o plagă operatorie poate să nu aibă nici o urmare; rezultatul se apără singure. Contaminarea hemoculturi cu o singură bacterie o compromite cu siguranță.

Cel care efectuează hemocultura nu trebuie să poarte obligator mască dar trebuie să lucreze cu mâinile bine spălate și uscate.

Se inspectează plia cotului și se așează pacientul cu brațul confortabil pentru a evidenția oît mai bine vena aleasă pentru punoție.



Se decontaminează plica cotului, pe o suprafață cât mai largă, cu săpun lichid apoi cu alcool iodat (sau spirt medicinal) și eter. Pentru fiecare soluție se folosesc tampoane noi de vată. În final, tegumentul decontaminat trebuie să rămână perfect uscat.

Se aplică, proximal față de regiunea astfel pregătită, un garou care să permită evidențierea venelor. Se puncționează, fără palpare prealabilă, vena cea mai accesibilă și se extrag aproximativ 10-12 ml sânge.

Sângele extras este imediat însămânțat în mediu de cultură. Pentru aceasta, acul seringii va fi îndepărtat fără a atinge amboul.

În timpul recoltării și însămânțării sîngelui ușile și ferestrele trebuie închise pentru a se evita formarea curenților de aer.

#### Însămînțarea

Cu excepția infecțiilor bacteriene sistemice specifice, simptomatologia clinică nu sugerează prezența în sânge a unei anumite bacterii, iar densitatea bacteriilor în probă este mică, motiv pentru care examenul microscopic nici nu se practică.

De aceea, însămînțarea se va face pe medii care să permită multiplicarea unui număr cât mai mare de specii microbiene aerobe și anaerobe cu exigențe nutritive diferite. Se vor folosi:

- un balon cu 100 ml. bulion infuzie creier-ini-



mă și

- un tub de 25x25 mm cu 50 ml bulion VF în prealabil regenerat. Ambele conțin citrat de sodiu în concentrație de 0,5%.

În fiecare din aceste medii sînt însemîntați cîte 5 ml sînge. Proporția minimă de 1:10 între sînge și mediu trebuie respectată pentru a anula astfel efectul antibacterian al sîngelui. Utilizarea unui anticoagulant previne înglobarea unor bacterii din sînge în coagul opac facilitînd vizualizarea culturii\*.)

Cel mai recomandat anticoagulant pentru hemoculturi este lichoidul (sodium polyanethol sulfonat) care inhibă coagularea sîngelui, neutralizează efectul bactericid al serului, previne fagocitoza și inactivează unele antibiotice: streptomicina, kanamicina, gentamicina și polimixina B.

Indicații speciale. Sînt situații cînd clinici-

\*) În endocardita subacută, unde streptococul viridans intervine ca agent etiologic în procent important de cazuri, se recomandă efectuarea hemoculturilor folosind metoda cheagului de fibrină preconizată de prof. Eugenia Duca: Se folosesc tuburi cu bulion glucozat 0,2% repartizat în coloană înaltă. Prealabil însemîntării, mediul este regenerat. Se însemîntează mai multe tuburi cu cîte 0,5-1,5 ml sînge prin prelingere pe peretele tubului deasupra mediului; tuburile sînt lăuate în repaus 30 min. pentru ca să se formeze cheagul de fibrină ancorat de peretele tubului. Coloniile de streptococ viridans dezvoltate în porțiunea superioară, transparentă a cheagului se observă cu ușurință.



anul solicită hemocultura pentru o anumită bacterie. Atunci se impune folosirea unor tehnici sau medii speciale.

Pentru bacilul tific, deși cultivă pe medii obișnuite, se indică folosirea bulionului bilă. În caz de bruceloză hemoculturile se fac de preferință în bulion ficat sau medii difazice; totodată se face și inocularea sîngelui intra-peritoneal la cobai. Pentru leptospire hemocultura se face în apă tamponată îmbogățită cu ser de iepure; de asemenea sîngele este inoculat intra-peritoneal la cobai.

#### Urmărirea și interpretarea

Hemoculturile sînt incubate la  $37^{\circ}\text{C}$  și examinate zilnic timp de o săptămînă și apoi după încă o săptămînă, la 14 zile putîndu-se da un rezultat definitiv.

Pozitivarea hemoculturilor se urmărește:

- macroscopic: se observă apariția coloniilor pe stratul de hematii de la fundul balonului (de exemplu, coloniile de stafilococ), turbiditatea, hemoliza, modificarea culorii mediului, apariția bulelor de gaz pe mediile anaerobe, apariția coloniilor pe cheagul de fibrină (dacă s-a folosit metoda cheagului de fibrină);

• Pentru izolarea brucelelor hemocultura se urmărește pînă la 30 zile.



anul solicită hemocultura pentru o anumită bacterie. Atunci se impune folosirea unor tehnici sau medii speciale.

Pentru bacilul tific, deși cultivă pe medii obișnuite, se indică folosirea bulionului bilă. În caz de bruceloză hemoculturile se fac de preferință în bulion ficat sau medii difazice; totodată se face și inocularea sîngelui intra-peritoneal la cobai. Pentru leptospire hemocultura se face în apă tamponată îmbogățită cu ser de iepure; de asemenea sîngele este inoculat intra-peritoneal la cobai.

#### Urmărirea și interpretarea

Hemoculturile sînt incubate la 37°C și examinate zilnic timp de o săptămînă și apoi după încă o săptămînă, la 14 zile putîndu-se da un rezultat definitiv.

Pozitivarea hemoculturilor se urmărește:

- macroscopic: se observă apariția coloniilor pe stratul de hematii de la fundul balonului (de exemplu, coloniile de stafilococ), turbiditatea, hemoliza, modificarea culorii mediului, apariția bulelor de gaz pe mediile anaerobe, apariția coloniilor pe cheagul de fibrină (dacă s-a folosit metoda cheagului de fibrină);

\*) Pentru izolarea brucelilor hemocultura se urmărește pînă la 30 zile.



- microscopio: se fac frotiuri colorate Gram, care se examinează cu imersia și în funcție de rezultatul acestui examen se procedează la

- subculturi pe geloză sînge, geloză chocolat, medii diferențiale în cazul bacililor gram-negativi, incubate aerob în atmosferă cu  $CO_2$  sau anaerob.

Cînd examenul microscopic evidențiază în hemo-cultură un microorganism cu o densitate optimă sau care poate fi ajustată optim, se efectuează antibiograma difuzimetrică folosind drept inoculum hemo-cultura pozitivă.

Pozitivarea hemoculturii și rezultatul antibiogrammei se impune a fi comunicate clinicianului într-un interval de timp cît mai scurt posibil. Identificarea ca specie a microorganismului izolat urmează a se efectua.

Prin antibiograma difuzimetrică se face o primă selecție a antibioticelor active *in vitro*; în continuare se recomandă stabilirea CMI pentru antibioticul ales, urmată de verificarea concentrațiilor realizate în sînge de acest antibiotic (vezi capitolul 9, pp 127-131).

Mai importantă decît identificarea ca specie a microorganismului izolat este implicarea sa ca agent etiologic întrucît criteriul de patogenitate nu are valoare în acest caz.



Pentru speciile oportuniste (condiționat sau accidental patogene) posibilitatea intervenției lor ca contaminanți este eliminată prin izolarea aceluiași microorganism din hemo-culturi repetate.)

---

•) Cei mai frecvenți contaminanți sînt Staphylococcus epidermidis și bacilii difterimorfi. Bacilii difterimorfi pot fi însă confundați morfologic cu Listeria monocytogenes, specie patogenă; de aceea nu vom eticheta o hemocultură drept contaminată cu bacili difterimorfi fără practicarea testelor de diferențiere.



Sînt de considerat:

- (i) puroiul din colecții închise,
- (ii) puroiul din colecții fistulizate și de pe suprafețe: cutanată (plăgi, arsuri, ulcere cutanate cronice) sau mucoase (conjunctivală, uretrală ș.a.).

### Recoltarea probelor

#### Materiale necesare

- seringă etanșă și ace cu calibru mare sterilizate;
- pipete Pasteur;
- tamponane pentru recoltări bacteriologice;
- materiale pentru decontaminare: apă sau ser fiziologic sterile, săpun lichid, spirt medicinal, eter, tamponane de vată, comprese, pensă;
- eprubete 16/160 mm.

Recoltarea de la nivelul colecțiilor închise (aboese, exsudate din cavitățile seroaselor ș.a.) se face prin puncție și aspirație cu seringă prevăzută cu un ac de calibru mare.

Recoltările din vezicule cutanate pot fi făcute prin puncție și aspirație cu pipeta Pasteur.

Decontaminarea tegumentului în vederea puno-



ționării unei colecții purulente se face cu aceleași precauții ca și pentru hemocultură.

Recoltarea de la nivelul fistulelor se face prin aspirație cu seringă după decontaminarea tegumentului în jurul fistulei și eliminarea primei porțiuni a puroiului.

Recoltarea de la nivelul plăgilor superficiale, arsurilor, impetigo, conjunctivei etc. se face cu tamponul.

Dacă plaga sau arsura este acoperită cu un exsudat purulent abundant se va proceda mai întâi la îndepărtarea, prin spălare cu ser fiziologic sau apă sterilă, a puroiului superficial intens contaminat. Dacă există cruste, vor fi detașate. Recolta trebuie făcută din imediata vecinătate a țesutului viu.

Recoltarea cu tamponul de la nivelul ulcerelor cutanate cronice nu dă rezultate bune din cauza masivei contaminări a exsudatului de la acest nivel. Rezultate mai bune se obțin dacă se recoltează lichidul interstițial de la periferia ulcerului. Se decontaminează tegumentul vecin marginii ulcerului cu săpun lichid, spirt medicinal și eter. Se puncționează tegumentul sănătos cu un ac hipodermic steril. Se introduce acul pînă cînd vârful său ajunge în vecinătatea marginii ulcerului și sub su-



prafata acestuia. Se comprimă ușor țesutul îndurat din jurul acului. Se retrage puțin acul și se aspiră cu o seringă sterilă etanșă. Cantitatea minimă de lichid interstițial astfel obținută este folosită extemporaneu pentru efectuarea a 1-2 frotiuri și însămânțare.

Puroiul aspirat cu seringă și introdus în eprubetă ca și probele recoltate pe tampoane sînt imediat expediate la laborator.)

Examenul macroscopic și microscopic al probelor de puroi permite orientarea diagnosticului și interpretarea rezultatelor culturii.

Se notează consistența, culoarea, mirosul, eventual prezența granulelor ș.a.

Puroiul cremos, bine legat apare în infecțiile stafilococice; puroiul fluid în cele streptococice; puroiul cazeos în cele cu bacil Koch.

Puroiul fluid cu granule mici (cca 0,25 mm diametru) albe sau gălbui sugerează o supurație actinomicotică.

Puroiul albastru verzui poate să apară în infecțiile cu bacil piosianio; puroi verde în cele pneumococice.

.) Procentajul izolării anaerobilor oxigen-sensibili din probele de puroi crește considerabil dacă transportul acestora se face în containere etanșe sub atmosferă de azot sau bioxid de carbon lipsită de  $O_2$



Puroiul brun-cenușiu murdar și fetid sugerează o infecție cu anaerobi.

Din probă se efectuează un frotiu colorat Gram pe care se urmăresc prezența, numărul și varietatea morfo-tinctorială a bacteriilor:

- coci gram-pozitivi în grămezi sau lanțuri (probabil stafilococi sau streptococi, aerobi sau anaerobi);
- bacili gram-negativ cu capete rotunjite sau efilate (probabil Enterobacteriaceae, bacil piocianic sau anaerobi);
- bacili gram-pozitivi sporulați - se va nota forma și dispoziția sporului (posibil specii de Clostridium);
- bacili gram-pozitiv ramificați (probabil Actinomyces sau Corynebacterium) ș.a.

Dacă puroiul provine dintr-o leziune subacută sau cronică, frotiul Ziehl-Neelsen este obligator pentru a urmări prezența micobacteriilor.

Dacă în probă sînt prezente granule, un granul este zădărit între 2 lame de microscop. După separarea lamelor, frotiurile astfel obținute sînt fixate și colorate: unul gram și altul Ziehl-Neelsen. Pentru colorația Ziehl-Neelsen, în acest caz, decolorarea nu va depăși 5-10 sec.

Pe frotiul colorat Gram, actinomicetul apare ca o masă înfîlcită de micelii ramificate gram pozitiv cu forme măciucate Gram-negative la periferie.

Colorația Ziehl-Neelsen permite în aceste cazuri diferențierea între Actinomyces și Nocardia; nocardia pot să apară acido-rezistente; în contrast, Actinomyces sînt totdeauna neacido-rezistente.



Rezultatele examenului direct microscopic sînt imediat comunicate clinicianului ca rezultate de etapă. Sînt utile pentru orientarea terapeutică.

### Cultura

Prima zi. Proba se epuizează pe suprafața a 2 plăci cu geloză sînge. din care una se incubează aerob și cealaltă anaerob.

Dacă proba provine dintr-o colecție închisă se va însămînța și într-un tub cu bulion VF pentru izolarea anaerobilor. Acesta permite și izolarea anaerobilor facultativi. Mediul lichid favorizează izolarea bacteriei infectante mai ales atunci cînd numărul indivizilor viabili din probă este mic.

Puroiul recoltat din fistule, plăgi, arsuri ș.a. nu se însămînțează în mediu lichid. Aceste infecții sînt frecvent mixte iar probele contaminate în proporții variate cu flora normală a regiunii în care evoluează supurația.

Dacă frotiul Gram a evidențiat o densitate bacteriană suficientă, indiferent de proveniența probei de puroi, din colecție închisă ori din plagă sau arsură, se efectuează o antibiogramă pe cultură primară.

A doua zi. Se examinează cu atenție plăcile cu ochiul liber și cu lupa de mînă în lumină directă și în lumină reflectată.

Dacă în aceste condiții nu a apărut o cultură, plă-



cile se reincubează pentru alte 24 ore, incubarea aerobă făcându-se în borcan cu luminare.

Dacă a apărut o cultură, se efectuează un frotiu Gram din fiecare tip de colonie dezvoltată. Se compară caracterele morfo-tinctoriale ale izolațiilor aerob și anaerob cu cele ale bacteriilor de pe frotiul gram din probă.

Dacă între izolați și frotiul din probă există discrepanțe (cultură săracă față de numărul bacteriilor observate în frotiul original, dintre izolați lipsește un tip morfo-tinctorial prezent în frotiul original ș.a.) incubarea trebuie continuată pentru ambele plăci.

Dacă a apărut o cultură pură pe ambele plăci și frotiul gram indică o identitate morfo-tinctorială, izolatul este un facultativ anaerob și se identifică pornind de la una din culturi.

Dacă pe ambele plăci cultura este mixtă, chiar dacă frotiul evidențiază tipuri de bacterii cu aceleași caractere morfo-tinctoriale, nu se poate ști în acest stadiu care sînt anaerobe și care facultativ anaerobe. Se procedează la repicarea fiecărui tip de colonie de pe placa incubată anaerob pe o placă cu geloză sînge care se incubează aerob. Izolații care nu cultivă în aceste condiții sînt anaerobi. Ei vor fi identificați pornind de la placa anaerobă. Restul sînt facultativ anaerobi și vor fi identificați ca atare.

Izolații care nu se regăsesc pe placa anaerobă sînt strict aerobi.

Pentru izolații anaerobi nesporulați este suficientă încadrarea într-un grup morfo-tinctorial (coci gram-pozitiv sau gram-negativ, bacili gram-pozitivi sau gram-negativi ș.a.). Pentru clostridii este necesară identificarea. Identificarea este de asemenea necesară pentru aerobi sau anaerobii facultativi.

Dacă antibiograma pe cultură primară nu poate fi interpretată, se poate proceda la antibiograma



pe cultură secundară.

### Interpretarea rezultatelor

Infectiile plăgilor și arsurilor sînt infecții mixte. Bacteriile izolate variază larg în funcție de împrejurările în care s-a produs plaga (plăgi traumatice: plăgi în viața civilă, plăgi de război, plăgi mușcate; plăgi chirurgicale), localizarea plăgii, vechimea ei ș.a.

Plăgile traumatice se infectează cu microbiota indigenă a pielii și cavităților vecine ariei lezate precum și cu saprofitii din praf.

În ordinea frecvenței se izolează:

Staphylococcus aureus,

Staphylococcus epidermidis,

Streptococcus pyogenes,

Escherichia coli,

Bacili diftericorfi,

Specii de Bacillus,

Proteus,

Specii de Pseudomonas,

Streptococi  $\alpha$ -hemolitici,

Streptococi  $\beta$ -hemolitici  
(alții decît grup A),

Coci gram-pozitiv anaerobi,

Bacili anaerobi nesporulați gram-pozitivi și gram-negativi,

Clostridium perfringens

Plăgile din regiunea coapselor, feselor și abdomenului inferior sînt mai frecvent infectate cu bacili gram-negativi intestinali.

Plăgile de război sînt mai frecvent infectate cu anaerobi, inclusiv clostridii, din cauză că sînt



plăgi delabrante, cu mortificări de țesuturi, contaminate cu pământ și fecale și din cauza temporizării tratamentului chirurgical.

Clinicianul trebuie avertizat asupra prezenței clostridiilor într-o plagă. El este cel care hotărăște asupra semnificației acestora: bacterii infectante sau de contaminare. Diagnosticul gangrenei gazoase și tetanosului sînt diagnostice clinice. Deci prezența clostridiilor într-o plagă nu înseamnă obligator gangrenă gazoasă sau tetanos.

Plăgile mușcate sau zgîriate de animale se pot infecta cu Pasteurella septica.

Plăgile operatorii din zone normal contaminate se infectează mai frecvent decît cele din zone normal sterile. Si aici intervin în infecție organismele din microbiota regiunii anatomice în care s-a intervenit.

Frecvent în infecțiile plăgilor operatorii intervin tulpini de spital: Stafilococi coagulazopozitivi, bacil piocianic, Escherichia coli (tulpini hemolitice), Proteus.

Arsurile de asemenea se infectează cu microbiota pielii și saprofizi oportuniști din praf. În mediu de spital infectarea arsurilor cu tulpini de spital este de temut și greu de eradicat.

Rar, în infecțiile plăgilor și arsurilor intervin

Haemophilus

Pneumococul,

Actinomyces, Nocardia,

Bacilul difteric.



În plăgi și arsuri este greu de stabilit ponderea fiecărui izolat, în fenomenul morbid, numai pe baza examenului bacteriologic al puroiului, mai ales atunci când printre izolați nu sînt patogeni recunoscuți (Streptococcus pyogenes, de exemplu)

Frecvent, însă, aceste infecții sînt bacteriemice. De aceea, nu se va pierde din vedere necesitatea efectuării de hemoculturi repetate la bolnavii cu plăgi și arsuri infectate, mai ales dacă au frison și febră. Bacteria izolată din hemocultură este cea cu pondere majoră în infecție.

Antibiograma pe cultură primară pentru puroiul din aceste infecții este importantă din 2 motive:

(i) sînt infecții mixte în care tratamentul antimicrobian nu trebuie aplicat față de bacteria X sau Y ci față de toate bacteriile infectante în proporțiile și în relațiile în care se află ele în focarul infecțios.

(ii) ACP constituie în același timp o mai bună metodă de izolare a bacteriilor din amestecul probe decât simpla epuizare. Nu este o raritate când pe placă cu ACP se izolează mai multe tipuri de bacterii decât pe plăcuțe pe care s-a făcut epuizarea simplă. După cum nu este o raritate situația în care, curînd după administrarea unui antibiotic, din proba de puroi nou recoltată se izolează (este demascată) o altă bacterie decât cea evidențiată inițial.

În leziunile ulcerative ale pielii cu evoluție cronică trebuie eliminată în primul rînd posibilitatea etiologiei sifilitice (examen serologic). Spectrul etiologic al infecțiilor acestor leziuni include:



Streptococ  $\beta$ -hemolitic  
(grup A sau alte grupe),  
Streptococi anaerobi,  
Stafileococ auriu,  
Specii de micobacterii,

Specii de Actinomyces,  
rar sînt în cauză:  
Erysipelothrix,  
Bacilul difteric.

Bacteriile evidențiate în purciul din colecții închise sînt agenții etiologici ai infecției. Contaminarea acestor probe cu saprofiți ai pielii sau mediului este rară (de regulă urmarea unor deficiențe în tehnica de recoltare) și redusă cantitativ.

Bacteriile izolate în aceste împrejurări sînt:

Stafileococul auriu,  
Streptococcus pyogenes,  
Pneumococul,  
M. tuberculosis,

Specii de Salmonella,  
N. gonorrhoeae,  
N. meningitidis,  
Specii de Brucella ș.a.

Examenul bacteriologic al exsudatului conjunctival din conjunctivite acute se conduce ca și examenul cricărui exsudat purulent. Pentru însămînțări se preferă geloza cu sînge de iepure sau cal ori geloza ciocolat sau geloza sînge cu strie de stafileococ. Moraxella lacunata se izolează mai ușor pe mediul Loeffler.

Spectrul etiologic al conjunctivitelor acute, cel mai frecvent, include:

Stafileococul auriu,  
Specii de Haemophilus,  
Pneumococul,  
N. gonorrhoeae,  
Streptococi hemolitici,  
Bacili coliformi,  
Pseudomonas,

Moraxella lacunata (rar),  
Bacilul difteric (rar),  
Virusuri ș.a.

Alte microorganisme (bacili difterimorfi, stafileococi coagulazo-negativi ș.a.) sînt numai contaminanți.



## DIAGNOSTICUL BACTERIOLOGIC AL MENINGITEI EXAMENUL BACTERIOLOGIC AL LICHIDULUI CEFALO-RAHIDIAN

Lichidul cefalo-rahidian normal este steril.

În cursul infecției meningiene se produc

(-) pătrunderea și multiplicarea agentului infecțios (bacterie, virus, ciupercă ș.a.) în lichidul cefalo-rahidian;

(-) modificări citologice și biochimice, unele din ele urmare a evoluției fenomenelor inflamatorii meningiene, altele legate de prezența și multiplicarea microbului în lichidul cefalo-rahidian.

Infectarea meningelor se poate produce

a) Pe cale hematogenă în cursul unei bacteriemii. De exemplu, nazofaringită meningococică → bacteriemie → meningită meningococică.

b) Direct din nazo-faringe prin țecile limfatice olfactive (meningococul, pneumococul, Haemophilus influenzae)

c) din focare infecțioase juxta meningiene (otomastoidită, sinuzită, tromboflebita sinusului cavernos ș.a.)

d) din exterior (naso-faringe, conduct auditiv extern, tegumente ș.a.) după fracturi craniene (meningitele traumatice cu cel mai variat spectru etiologic), anomalii congenitale (meningococul, pneumococul) și puncții rahidiene sau intervenții chirurgicale pe nevrax (meningitele iatrogene cu tulpini bacteriene de spital).

Apărută pe o cale sau alta, infecția meningelor este un focar bacteremic.



Așadar, cercetarea prezenței bacteriilor în lichidul cefalo-rahidian este o etapă indispensabilă pentru diagnosticul etiologic al unei meningite. Examenul citologic și biochimic efectuate în paralel orientează acest diagnostic.

La bolnavul cu meningită bacteriană hemocultura poate fi de asemenea de folos pentru izolarea bacteriei infectante. Examenul bacteriologic al exsudatului nazofaringian, din urechea medie ș.a. sînt examene complementare care pot stabili focarul primar al infecției.

Bacteriile care se izolează din lcr, în ordinea frecvenței, sînt:

(i) la nou-născut și sugarul pînă la 2 luni

<u>Enterobacteriaceae</u>	<u>H. influenzae,</u>
( <u>Escherichia, Salmonella ș.a.</u> ),	<u>Bacilul piccianic,</u>
<u>Stafilococi coagulazo-pozitivi,</u>	<u>L. monocytogenes</u>
<u>Pneumococi,</u>	

(ii) la copil

Neisseria meningitidis,  
Pneumococi,  
Haemophilus influenzae

(iii) la adult

Pneumococi,  
N. meningitidis,  
Stafilococi coagulazo-pozitivi,  
Bacili gram-negativi,  
Listeria monocytogenes.

Meningita tuberculoasă apare cu o frecvență variabilă și în general mai redusă în raport cu alte etiologii (meningococică, pneumococică ș.e.)



### Recoltarea și transportul probelor de lichid cefalo-rahidian

Recoltarea se face prin puncție, obișnuit, lombară, în condiții riguros aseptice. Cantitatea necesară pentru examen, 5-10 ml, se recoltează în 2 tuburi de centrifugă și se transportă fără întârziere la laborator. Pe durata transportului și în laborator, pe parcursul examinării, proba se menține la 37°C.

### Examenul de laborator

#### (1) Examenul macroscopic

Lichidul cefalo-rahidian normal este incolor și clar. Se urmăresc: culoarea, turbiditatea, existența eventuală a unui depozit sau cheag.

În cursul unei meningite, în funcție de importanța reacției celulare, lichidul cefalo-rahidian poate fi clar, opalescent sau purulent.

Unul din tuburi, după prelevarea cantității de lichid necesară numărării elementelor celulare, este centrifugat 10 min. la 3000 rpm. După centrifugare se notează aspectul supernatantului și al sedimentului. Supernatantul este decantat steril și supus examenelor biochimice. Din sedimentul resuspendat într-o mică cantitate de lichid

- se fac însămînțări pentru izolare și
- se efectuează 3 frotiuri.



Dacă proba prezintă cheag de fibrină, acesta se prelevă steril și din el se efectuează cele 3 frotiuri. Bacteriile, dacă sînt prezente, și celulele se adsorb pe cheag. Restul probei se centrifughează.

(2) Numărarea elementelor celulare se face după agitarea probei. Se folosește o celulă de numărare Fuchs-Rosenthal sau Nageotte. La probe cu cheag sau purulente numărarea elementelor nu mai este necesară.

Normal, lichidul-cefalo-rahidian conține sub 3 elemente/mm<sup>3</sup> (de regulă limfocite). Numărul de leucocite în lcr prezintă o creștere variabilă în funcție de natura meningitei și de stadiul evolutiv: pînă la cîteva mii/mm<sup>3</sup> în meningitele acute bacteriene (aspect purulent), între 50-500 elemente/mm<sup>3</sup> în meningita tuberculoasă (lichid clar sau opalescent), 50-1000 elemente/mm<sup>3</sup> în meningitele virale (lichid clar sau opalescent). În faza precoce a meningitelor bacteriene numărul elementelor în lcr poate fi redus.

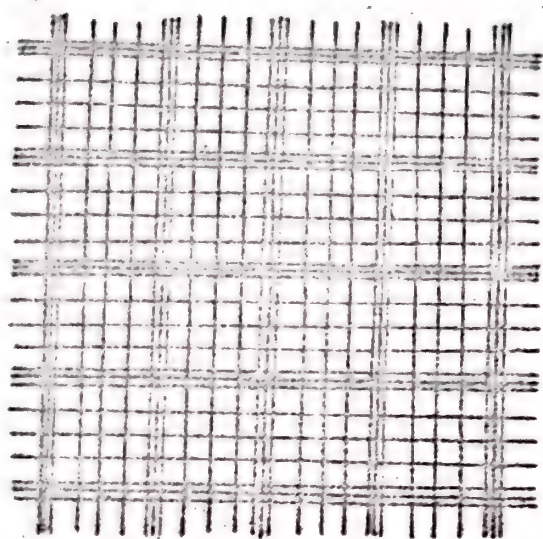
În cazul lichidelor clare, numărarea elementelor celulare din probă stabilește deci dacă este sau nu o meningită.

### (3) Examenul direct microscopic

Unul din frotiuri este colorat cu albastru de metilen sau, mai bine, May-Grünwald-Giemsa pentru



examenul citologic. Albul este colorat Gram pentru



1 mm

Fig.53 Rețeaua camerei de numărare Fuchs-Rosenthal. Camera Fuchs-Rosenthal are adâncimea de 0,2 mm. Rețeaua este formată din 16 pătrate mari, fiecare cu suprafața de 1 mm patrat, delimitate prin linii triple. Pentru numărătoare se folosește un obiectiv 40x. Uzual se numără elementele de pe 4 pătrate mari în diagonală. Se obține un număr N de elemente. Nr.de elemente/mm cub =  $N \times 1,25$  (rezultă din  $N \times 5/4$ ).

urmărirea bacteriilor. Al treilea frotiu este păstrat pentru a fi colorat Ziehl-Neelsen sau, mai bine, cu auramină pentru cazurile în care se suspectează infecția tuberculoasă.

Examenul citologic al sedimentului lor orientează diagnosticul meningitei.

(i) Dacă predomină reacția cu polinucleare este vorba, cel mai verosimil, de o meningită bacteriană. Dar și în faza precoce a meningitei tuberculoase sau a meningitelor virale polinuclearele pot predomină.

Frotiul colorat Gram va fi examinat cu cea mai mare atenție pentru a decela eventual prezența bacteriilor. Evidențierea la examenul direct



microscopic a bacteriilor cu caracterele lor morfologice orientează rapid și judicios tratamentul antimicrobian, care în meningite este o urgență.

Frotiurile din probele de lcr de la bolnavi care au primit antibiotice înainte de recoltarea probei trebuie să fie interpretate cu prudență. Pe asemenea frotiuri bacteriile pot să fie reduse ca număr sau chiar absente (în special meningococii și pneumococii<sup>\*)</sup>), bacteriile gram-pozitive pot să apară gram-negative.

(ii) Dacă predomină reacția limfocitară poate fi vorba, cel mai verosimil, de o meningită virală sau tuberculoasă.

În cazurile suspecte de tuberculoză, pentru efectuarea frotiului destinat cercetării bacilului tuberculozei, se va proceda astfel: se etalează o picătură din sediment în centrul unei lame noi. După uscare, se suprapune o nouă picătură și tot așa de câteva ori la rând. În acest mod se realizează o concentrare a bacililor, eventual prezenți, pe o arie restrinsă. Se colorează Ziehl-Neelsen (când este posibil, se preferă colorația fluorescentă cu auramină).

#### (4) Izolarea

Rezultatele examenului direct microscopic sînt numai orientative: de multe ori nu pot fi evidenți-

\*) În asemenea situații se poate recurge la o metodă sensibilă de evidențiere în proba de lcr a antigenelor bacteriene: reacția de precipitare inelară în capilare sau, mai bine, imunelelectroforeza discontinuă contracurent cu seruri specifice.



ate bacteriile și chiar atunci când sînt observate identitatea lor rămîne numai aproximativă. Investigarea probei continuă cu izolarea bacteriei, testarea sensibilității față de antibiotice și în final identificarea sa.

(i) Prime si. O placă cu geloză sînge și una cu geloză chocolat sînt însemîntate din sediment (pe suprafața mediului sînt depuse 1-2 picături separate de inoculum fără a-l dispersa). Plăcile sînt incubate în borcan cu lumînare în atmosferă umedă.

Din proba de lcr necentrifugată se însemîntează: un tub cu bulion glucozat, un tub cu bulion Lewinthal (bulion cu factor X și V pentru izolarea H. influenzae) și un tub cu bulion VF cu carne prăjită (cîte 1-1,5 ml/tub).

Culturile se incubează peste noapte la 37°C și se examinează a doua zi.

(ii) A doua zi

- Pe plăci a apărut o cultură în aria inoculată. Se procedează la antibiogramă și identificarea bacteriei izolate.

- Pe plăci nu a apărut o cultură. Se reincubează pentru alte 24 ore. Se examinează tuburile cu mediu lichid. Dacă prezintă turbiditate, se fac repicări pe medii adeovate după ce a fost examinat frotiul Gram din tuburile cu creștere.

Dacă atît plăcile cît și tuburile nu prezintă cultură, sînt reincubate la 37°C cu examinare zilnică pînă la 3 zile. Urmărirea culturilor se face



pînă la 7 zile dacă pacientul a primit antibiotice înainte de recoltarea probei. De fapt, la acești pacienți chiar în lipsa efectului terapeutic procentajul izolărilor scade mult.

În majoritatea meningitelor bacteriene agentul etiologic poate fi izolat dacă proba a fost recoltată înainte de începerea tratamentului antimicrobian.

În cazurile suspecte de meningită tuberculoasă, se va epuiza întreaga cantitate de lcr din cel de al doilea tub prin însămînțare pe mai multe tuburi cu mediu Loewenstein-Jensen și inoculare intra-peritoneală la cobai. Dacă dispunem de o cantitate mai mare de lcr, se centrifughează 30 min. la 3000 rpm iar sedimentul va servi la însămînțări și inoculare.

#### (5) Examenul biochimic

Se efectuează pe supernatantul rezultat din centrifugarea probei. Se urmăresc modificările apărute ca urmare a

(i) creșterii permeabilității barierei hematoencefalice prin procesul inflamator: creșterea proteinorahiei. În mod normal lcr conține 15-40 mg proteine la 100 ml. În meningitele bacteriene acute sau în cea tuberculoasă proteinorahia este considerabil crescută (cel mai frecvent peste 100 mg%). În meningitele virotice este ușor crescută (de obicei nu depășește 100 mg%).



(ii) cultivării bacteriilor în lichidul cefalorahidian. Este caracteristică scăderea glicorahiei în cursul meningitelor bacteriene (inclusiv meningita tuberculoasă) și menținerea ei în limite normale (50-70 mg%) în cursul celor virale.

În lor pot fi evidențiați o serie de metaboliți bacterieni. De exemplu, acidul lactic în meningitele bacteriene sau alcoolul etilic în cele micotice, ambele substanțe ca metaboliți finali ai glucozei.

Clorurorahia este scăzută numai în meningita tuberculoasă (normal 0,73 g%).

#### In concluzie

Examenul direct microscopic (numărarea elementelor celulare, examen citologic, prezența, morfologia și afinitatea tinctorială a bacteriilor din probă) permite în interval de cca o oră orientarea diagnosticului etiologic și a terapiei antimicrobiene de urgență a meningitei.

În absența bacteriilor pe frotiu, datele examenului citologic coroborate cu ale celui biochimic vor orienta mai sumar, dar tot atât de repede, diagnosticul.

Izolarea bacteriei infectante și antibiograma (date care se obțin după minimum 24-48 ore) eventual vor corecta, dacă va fi nevoie, tratamentul antimicrobian deja instituit. Identificarea bacteriei infectante este ultima etapă a diagnosticului.



Modificări microbiologice, citologice și biochimice ale l.o.o.r. în  
scurtul debutor meningitei

Tipul de Aspectul meningitei	Aspectul l.c.r.	Examen ml- grobologic.	Examen ol- tologic	Examen biochimic
l.c.r. normal	clar, incolor	steril	0-3 limfo- cite/mm <sup>3</sup>	proteine 15-40 mg% glucoză 50-70 mg% cloruri 730 mg%
Meningite bacterie- ne acute	opales- cent, pu- rulent	se izolea- ză bacte- rie	polinuclea- re frec- vent peste 500-1000/mm <sup>3</sup>	proteine mult $\nearrow$ glucoză $\searrow$ acid lactic pre- zent
Meningita tubercu- loasă	clar sau ușor opa- lescent	se izolea- ză b.tuber- culozel	limfocite în jur de 200/mm <sup>3</sup>	proteine $\nearrow$ glucoză $\searrow$ cloruri $\searrow$ acid lactic pre- zent
Meningite mucocice	clar sau opales- cent	se izolea- ză clupere- ce	predomină limfocite $\nearrow$ 100-500/mm <sup>3</sup>	proteine $\nearrow$ glucoză $\searrow$ alcool etilic prezent
Meningite virotice	clar sau opales- cent	steril bac- teriologic se poate izo- la virus	limfocite în jur de 500-1000/mm <sup>3</sup>	proteine $\nearrow$ sau $\rightarrow$ glucoza normală cloruri normale



Infecția căilor urinare (ICU) este frecventă și afectează toate grupele de vîrstă și ambele sexe.

ICU localizate la diferite nivele - uretrite, cistite, pielonefrite -, pot evolua inaparent sau aparent, acut sau cronic.

Prezența infecției la nivelul căilor urinare se însoțește de bacteriurie și, mai rar, de bacteriemii

Diagnosticul ICU nu poate fi stabilit numai prin examenul clinic:

- multe ICU sînt asimptomatice,
- infecția lipsește la cca 46% din pacienții cu simptomatologie sugestivă pentru ICU.

Demonstrarea bacteriuriei prin urocultură este singura metodă care permite diagnosticul de infecție a căilor urinare.

Urina vezicală normală este sterilă. Ea se contaminează cu bacteriile de colonizare a uretrei distale și vulvei, pe care le spală în cursul micțiunii.

Contaminanții cel mai frecvent izolați din



probele de urină recoltate în cursul micțiunii:

Escherichia coli și bacili coliformi,  
Specii de Proteus,  
Stafilococi coagulazo-negativi,  
Enterococi,  
Bacili difterimorfi,  
Specii de Neisseria „nepretențioase”,  
Lactobacili,  
Levuri,  
Specii de Bacillus,  
Ocazional stafilococi coagulazo-pozitivi,  
Ocazional Pseudomonas aeruginosa.

După puține zile de spitalizare în flora uretrei distale și a vulvei, secundar colonizării colonului, își pot face apariția tulpinile de spital (Escherichia coli, Klebsiella, stafilococi coagulazo-pozitivi, bacilul piocianic).

Majoritatea ICU sînt date de microorganisme saprofite oportuniste din flora fecală: bacterii și rareori levuri din flora uretrei distale - infecții ascendente. Mai rar, ICU cu bacterii oportuniste pot rezulta și prin înșămîntare hematogenă sau limfatică cu diferite puncte de plecare (osteomielite, infecții genitale ș.a.) - infecții descendente.

Microorganismele patogene sînt rareori implicate în etiologia ICU.



### Depistarea și semnificația bacteriilor patogene în urină

Bacteriile patogene ajung în căile urinare pe cale hematogenă în cursul unor infecții sistemice.

Localizarea renală a bacteriilor patogene poate fi o etapă obligatorie (cazul leptospirozelor) sau întâmplătoare (cazul tuberculozei, brucelozei).

În alte infecții eliminarea prin urină a bacteriei patogene are loc fără ca localizarea renală să fie demonstrată (cazul febrei tifoide).

Bacteriile patogene nu găsesc în urină un mediu prielnic pentru înmulțire.

Bacteriile patogene sînt căutate prin metode speciale de însămînțare și inoculare (vezi capitolele corespunzătoare din partea a V-a) a sedimentului urinar, metode pe care laboratorul (anterior avizat) le execută numai la indicație clinică specială: suspiciune de tuberculoză renală, leptospiroză etc.

Recoltarea urinei pentru diagnosticul tuberculozei renale: se recoltează în totalitate urina de dimineață\*) în baloane sterile, după o prealabilă toaletă locală (vezi mai jos). Pentru a obține un volum mai mic de urină, convenabil în prelucrarea ulterioară prin centrifugare a probei, se

\*) Contactul prelungit cu urina are efect nociv asupra bacilului tuberculozei. De aceea este contraindicată efectuarea examenului pe urina colectată timp de 24 ore.



indică bolnavului reducerea consumului de lichide în ziua premergătoare recoltării. De asemenea se va suspenda orice administrare de medicamente și în mod deosebit vitamina C. Administrarea tuberculo-staticelor se va întrerupe cu cel puțin o săptămână înainte.

Pentru a mări șansele de evidențiere a agentului etiologic în tuberculoza renală, examenul bacteriologic se va face pe 3-4 probe recoltate succesiv la interval de 1-2 zile.

Recoltarea urinei pentru evidențierea leptospirelor: se face după alcalinizarea urinei prin administrare per os, în ziua precedentă, a 5-10 g citrat de potasiu divizate în 3 doze administrate la mese sub formă de capsule enterice pentru a micșora iritația gastrică.

Depistarea și semnificația bacteriilor și levurilor condiționat patogene în urină. Urocultura cantitativă

În ordinea frecvenței bacteriile oportuniste implicate în ICU sînt:

Escherichia coli

Klebsiella, Enterobacter,

Proteus,

Enterococi,

Stafilococi coagulaze-negativi, sînt mai rar găsite.

Ps.aeruginosa,

Stafilococi coagulazopozitivi,

Alte bacterii și  
Candida albicans



Urina constituie un excelent mediu de cultură în care bacteriile oportuniste infectante se multiplică în intervalul dintre 2 micțiuni pînă la valori mai mari de 100.000 bacterii/ml.)

În urina normală, examinată imediat după recoltarea în cursul micțiunii spontane, bacteriile oportuniste de contaminare nu depășesc 1000/ml.

Prezența în urină a mai mult de 100.000 bacterii/ml este semnificativă pentru ICU cu bacili gram-negativi intestinali sau enterococi - bacteriurie semnificativă.)

Diferențierea certă a bacteriuriei semnificative de bacteriile de contaminare normală a urinei se face numai pe baza aprecierilor cantitative prin examen microscopic direct..), confirmat de urocultura cantitativă, pe probe de urină corect recoltate și examinate imediat după recoltare.

Aprecierea cantitativă a bacteriilor din urină

Recoltarea urinei pentru examenul bacteriologic

Recoltarea probelor de urină pentru examenul

..) Această cifră corespunde capacității de multiplicare în urină a bacililor gram-negativi intestinali, a bacilului piocianic și enterococilor. Pentru stafilococi viteza de multiplicare în urină este mai redusă iar pentru Candida și mai redusă. De aceea bacteriuria semnificativă pentru ICU cu stafilococi este de 50.000/ml iar pentru cele cu Candida de 1000/ml.

..) Există și alte neamărate teste de triaj pentru bacteriurie. Cei interesați pot consulta bibliografia indicată.



Urina constituie un excelent mediu de cultură în care bacteriile oportuniste infectante se multiplică în intervalul dintre 2 micțiuni pînă la valori mai mari de 100.000 bacterii/ml.)

În urina normală, examinată imediat după recoltarea în cursul micțiunii spontane, bacteriile oportuniste de contaminare nu depășesc 1000/ml.

Prezența în urină a mai mult de 100.000 bacterii/ml este semnificativă pentru ICU cu bacili gram-negativi intestinali sau enterococi - bacteriurie semnificativă.)

Diferențierea certă a bacteriuriei semnificative de bacteriile de contaminare normală a urinii se face numai pe baza aprecierilor cantitative prin examen microscopic direct, confirmat de urocultura cantitativă, pe probe de urină corect recoltate și examinate imediat după recoltare.

Aprecierea cantitativă a bacteriilor din urină

Recoltarea urinii pentru examenul bacteriologic

Recoltarea probelor de urină pentru examenul

\*) Această cifră corespunde capacității de multiplicare în urină a bacililor gram-negativi intestinali, a bacilului piocianic și enterococilor. Pentru stafilococi viteza de multiplicare în urină este mai redusă iar pentru Candida și mai redusă. De aceea bacteriuria semnificativă pentru ICU cu stafilococi este de 50.000/ml iar pentru cele cu Candida de 1000/ml.

\*\*) Există și alte neenumărate teste de triaj pentru bacteriurie. Cei interesați pot consulta bibliografia indicată.



bacteriologic se face în recipiente sterile cu gura largă (diametrul de minimum 5 cm): borcane de miere, de exemplu.

Recoltarea se face la minimum 3 ore de la micțiunea anterioară, pentru a lăsa organismului infectant timpul necesar multiplicării în urina vezicală până la valori care să-l diferențieze ușor de bacteriile de contaminare.

Proba de urină pentru examenul bacteriologic se recoltează din jetul mijlociu în cursul micțiunii spontane după toaletă îngrijită a organelor genitale. Asupra acestor amănunte pacientul este instruit în prealabil. De multe ori se impune intervenția directă a surorii.

La femeie se spală regiunea vulvară și orificiul vaginal cu apă și săpun, se clătește din abundență cu apă fiartă și în final se usucă cu grijă folosind un prosop steril. Pacienta urinează cu labilele depărtate și prinde în borcan jetul mijlociu ~~de urină, cu grija~~ să nu atingă gura borcanului de piele sau lenjerie.

La pacientele cu scurgeri vaginale trebuie să intervină sora care pregătește de aceeași manieră regiunea vulvară și orificiul vaginal și în final introduce în vagin un tampon de vată. În acest sens, menționăm că o probă de 100 ml urină normală contaminată cu numai 1 ml scurgere vaginală infectată prezintă în urocultura cantitativă  $10^6$  bacterii/ml, ceea ce falsifică evident rezultatele examenului.



La bărbat se retractă prepuțul și se spală de manieră similară glandul și meatul urinar după care se usucă cu grijă regiunea.

La pacienții cu infecții prostatice contaminarea probei cu bacteriile de la acest nivel este inevitabilă. Pentru stabilirea sediului infecției în aceste cazuri se recurge la recoltarea de probe seriata.

Recolta seriată: proba 1 - primii 10 ml de urină eliminați; proba 2 - jetul mijlociu (după cca 200 ml urină de spălare); masaj prostatic; proba 3 - secreție prostatică; proba 4 - primul jet de 10 ml urină după masaj. Se face imediat numărătoarea bacteriilor în fiecare probă.

Procedura de recoltare trebuie adaptată după caz - scopul examenului, starea pacientului, vîrstă ș.a.

Recoltarea la gravide în cadrul consultului prenatal (depistarea activă a infecției urinare).

Fără de numărul mare de pacienți este practic imposibil să se recurge sistematic la metoda standard de recoltare. Pacientei i se înmînează borcanul și este instruită asupra modului de recoltare a jetului mijlociu. Pacienta urinează fără alte pregătiri într-un WC care are asigurat un minimum de condiții igienice. Probele sînt supuse apoi imediat triajului bacteriologic (vezi nota \*\*) de la subso-  
lul paginii 291). De la pacientele la care triajul a evidențiat o bacteriurie semnificativă, se recoltează și se examinează după procedeul standard (urocultură cantitativă) o nouă probă de urină.

Recoltarea de la pacientele imobilizate la pat se face de către soră. După toaleta organelor genitale pacienta urinează pe bazinet. Sora reține jetul mijlociu. Paciente-



le care urinează dificil în poziție culcată vor fi ridicate și sprijinite în șezut în pat sau la marginea patului pe un mic taburet. Dacă procedînd de această manieră nu se poate obține o probă satisfăcătoare, se recurge la puncția suprapubiană.

#### Recoltarea de la copii

Recoltarea corectă de la copii prea mici pentru a putea coopera este dificilă. Se face toaleta organelor genitale. Pentru a preîntîmpina contaminarea probei cu bacterii din regiunea anală, în jurul penisului sau a vulvei se fixează orificiul unei pungi sterile din material plastic de mărime adecvată vârstei copilului. În lipsa unui asemenea dispozitiv, recoltarea se face într-un flacon cu gura largă. Trebuie pîndit momentul micțiunii pentru a putea „prinde” proba. Micțiunea la copilul mic putînd fi declanșată de stimuli externi, recoltarea probei de urină se va face înainte de a supune copilul altor manipulări: cîntărire, injecții ș.a.

#### Recoltarea prin puncție suprapubiană .

Recoltarea urinei prin cateterism trebuie evitată ori de cîte ori este posibil, chiar la femeie, din cauza riscului înșămîntării bacteriene a vezicii. Cateterismul în condițiile colonizării colonului și uretrei anterioare cu tulpini bacteriene de spital expune pacientul riscului unor infecții foarte greu de tratat.

Ca metodă alternativă cateterizării, pentru obținerea unui canton necontaminat, a fost propusă aspirația prin puncție suprapubiană. Manevra este ușor suportată de pacient și îl supune la mai puține riscuri.

Pacientul este pregătit ca pentru o incizie chirurgicală. Puncția se face suprapubian, pe linia mediană, după anestezie locală. În prealabil pacientul este bine hidratat și instruit să nu urineze, astfel încît vezica să fie palpabilă în momentul procedurii.

Recoltarea prin puncție suprapubiană nu este posibilă la pacienții cu capacitate vezicală redusă sau la cei cu polakiurie.

De la pacienții cu polakiurie se recoltează urina emisă spontan. Recoltarea din jet mijlociu poate să nu fie



posibilă și nici nu este necesară: însăși frecvența micțiunilor realizează îndepărtarea contaminanților uretrei.

Probele de urină sînt transportate în cel mai scurt timp la laborator. Dacă un interval mai mare de o oră este inevitabil între recoltare și examinare, proba se refrigerază imediat la 4°C iar transportul se face în condiții de refrigerare. Examenul probelor refrigerate nu va întîrzia mai mult de cîteva ore de la recoltare. În buletinul de trimitere a probei este obligatorie consemnarea orei recoltei.

**In concluzie**

Nici un laborator și nici o tehnică de laborator nu poate da un rezultat corect pe o probă de urină neîncăpșită recoltată și necorespunzător transportată sau neexaminată în timp util.

Examenul direct microscopic și valoarea sa

Din proba de urină necentrifugată - cel mai bine imediat după recoltare - se efectuează cu ansa cu buclă de 4 mm diametru un frotiu. Se usucă, se fixează, se colorează Gram și se examinează la microscop cu imersie (90x). Prezența a minimum o bacterie în majoritatea câmpurilor examinate semnifică cu certitudine de 85-90% bacteriuria mai mare de 100.000/ml.



Examenul microscopic al frotiului gram din urina proaspăt recoltată și necentrifugată este cea mai simplă metodă, suficient de sensibilă, pentru detectarea bacteriuriei semnificative. Este la îndemîna oricărui medic care dispune de microscop și cunoștințele necesare. Orientează diagnosticul în interval de cîteva minute.

### Urocultura cantitativă

(1) Din proba de urină necentrifugată se efectuează 3 diluții decimale după cum urmează:

$10^{-1}$  = 9 ml ser fiziologic + 1 ml urină,

$10^{-2}$  = 9 ml ser fiziologic + 1 ml din diluția  $10^{-1}$ ,

$10^{-3}$  = 9 ml ser fiziologic + 1 ml din diluția  $10^{-2}$ .

Pentru fiecare diluție se utilizează cîte o pipetă gradată de 1 ml. După fiecare pipetare tuburile cu diluții se agită foarte bine.

(2) Din fiecare diluție se pipetează 1 ml în cîte o placă Petri sterilă și marcată.

(3) Imediat, în fiecare placă se toarnă 20 ml geloză nutritivă topită și răcită la 50°C. Se agită plăcile pentru uniformizare.

(4) După solidificarea mediului plăcile sînt incubate peste noapte la 37°C.

(5) A doua zi se numără coloniile de pe plăcile cu mai mult de 30 colonii și mai puțin de 300.

Dacă nu a apărut o cultură, plăcile se reincubează pînă la 48 ore înainte de a se raporta un rezultat negativ.



$$\text{Nr. bacterii/ml urină} = \frac{\text{Nr. colonii de pe placă}}{\text{x diluția}}$$

Interpretarea rezultatelor uroculturii cantitative.

Prezența a mai mult de  $10^5$  bacterii/ml urină într-o singură probă din jet mijlociu semnifică existența ICU cu o certitudine de 80%. Repetarea rezultatului pe o a doua și a treia probă consecutivă crește această certitudine respectiv la 90 și 100%.

Prezența a mai puțin de 10.000 bacterii/ml urină din jet mijlociu ține de contaminarea probei.

Prezența a  $10^4$ - $10^5$  bacili gram-negativi/ml urină poate fi urmarea ICU. Repetarea uroculturii va confirma sau va infirma aceasta. Bacteriuriile de acest ordin de mărime cu stafilococ sau Candida sînt semnificative.\*)

Pentru probele de urină recoltate prin puncție suprapubiană simplă prezența a bacteriilor este semnificativă pentru ICU.

Creșterea diurezei la pacienții cu ICU sau administrarea de substanțe antimicrobiene cu eliminare urinară scad numărul de bacterii/ml de urină. Este un aspect de care trebuie să se țină seama în interpretarea rezultatelor uroculturii cantitative.

Interpretarea examenului bacteriologic cantitativ pe

\*) Vezi nota .) de la subsolul paginii 291.



probe seriate pentru localizarea infecției la nivelul căilor urinare inferioare (uretră, vezică, prostată).

Numărul bacteriilor/ml în proba 1 > decît în proba 4, cu proba 2 sterilă = uretrită; numărul bacteriilor/ml în probele 3 și 4 > decît în proba 1 = prostatită; numărul bacteriilor/ml în proba 3 > decît în proba 4 = prostatită cronică. Pentru identificarea prostatitei atunci cînd proba 2 este pozitivă se administrează 2-3 zile antibioterapie activă în urină după care se face o nouă recoltă seriată.

În ordinea frecvenței, prostatitele sînt determinate de bacili gram-negativi, în special colibacili, gonococ, Candida, Trichomonas.

Examenele bacteriologic și seroimunologic sînt indispensabile pentru stabilirea localizării sediului infecției la nivelul căilor urinare (uretrită, prostatită, cistită, pielonefrită). Celor interesați asupra acestor amănunte le recomandăm, din bibliografia capitolului, revista literaturii făcută de Duca și Buiuc (1976).

./.



### 30 DIAGNOSTICUL BACTERIOLOGIC AL INFECTIILOR CAILOR RESPIRATORII SUPERIOARE

Infecțiile căilor respiratorii superioare (ri-  
nite, angine, laringite) sînt determinate cel mai  
frecvent de virusuri. Infecțiile bacteriene la a-  
ceste nivele evoluează ca infecții primare sau ca  
infecții secundare infecțiilor virale sau altor con-  
diții care scad rezistența antiinfecțioasă a orga-  
nismului (prematuri, nou născuți, boli de sînge, i-  
ritații chimice, deshidratare excesivă a mucoaselor  
ș.a.) Infecțiile micotice (candidoze) evoluează ca  
infecții secundare.

Dintre infecțiile bacteriene primare, pe  
primul loc, ca frecvență și importanță a  
complicațiilor postinfecțioase, se situ-  
ează anginele determinate de Streptococ-  
cus pyogenes.

Texiinfecția difterică, frecventă altădată, astăzi  
este rară. Epiglotita acută determinată de Haemo-  
philus influenzae este o infecție bacteriemică a  
copilului mic (6 luni-2 ani).

Infecțiile secundare ale căilor respiratorii  
superioare și cavității bucale sînt determinate de  
unii saprofizi și comensali oportuniști ai acestor  
mucoase.



Examenul bacteriologic al exsudatului farin-  
gian se efectuează în scopul

(i) diagnosticării anginelor streptococice și  
altor angine bacteriene sau micotice care, spre de-  
osebire de cele virale, beneficiază de antibiotera-  
pie;

(ii) stabilirii porții de intrare în toxiin-  
fecții cum sînt scarlatina și difteria;

(iii) depistării focarului infecțios în reu-  
matismul articular acut și glomerulonefrita difu-  
ză acută;

(iv) depistării purtătorilor de S. pyogenes,  
stafilococ auriu și bacil difteric.

Examenul bacteriologic al exsudatului nazo-  
faringian se efectuează în scopul

(i) izolării meningococului, pneumococului,  
H. influenzae, bacterii care se găsesc mai frecvent  
la acest nivel decît în nas și faringe;

(ii) diagnosticării unor infecții din vecină-  
tate cum sînt infecțiile bronho-pulmonare la pa-  
cienți care nu expectorează (copilul mic) (vezi ca-  
pitoul 31, p. 316).

Examenul bacteriologic al exsudatului nazal  
(nări) se efectuează în scopul depistării purtăto-  
rilor de stafilococ auriu și S. pyogenes.



Normal, mucoasele nazală, nazo-faringiană, faringiană și bucală sînt populate de un număr considerabil de microorganisme aparținînd unor diverse specii saprofite și comensale, anaerobe și aerobe (fig.54).

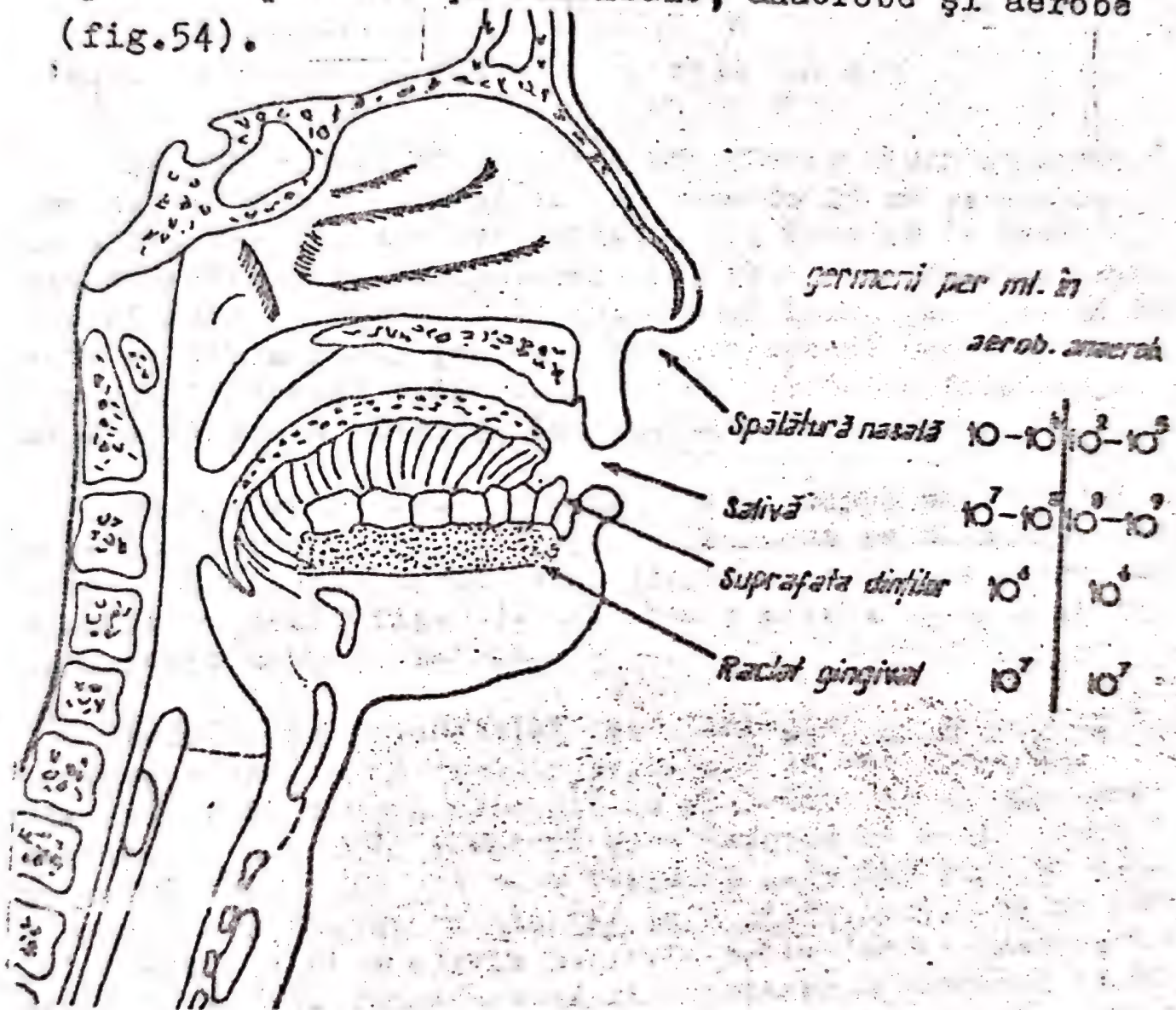


Fig.54 Căile aeriene superioare (secțiune schematică). Reprezentare sugestivă pentru densitatea populării normale a acestor mucoase cu bacterii și fungi (după Rosebury, 1962)



Unele dintre aceste specii comensale nu au putut fi implicate în infecții ale căilor respiratorii superioare:

Streptococci  $\alpha$ -hemolitici,  
Staphylococcus epidermidis,  
Neisseria „nepretențioase”,  
Veillonella,  
Bacili difterinorfi.

Specii comensale pentru care a fost dovedită implicarea în infecții ale căilor respiratorii superioare

Staphylococcus aureus,  
Haemophilus influenzae,  
Klebsiella și alți coliformi,  
Pneumococi,  
Candida albicans.

### Recoltarea și transportul probelor

Pentru un examen bacteriologic concludent al exsudatelor faringian și nazofaringian recoltarea probelor trebuie făcută înainte de administrarea oricărui tratament antimicrobian.

Exsudatul faringian se recoltează cu tamponul. Faringele trebuie bine expus și iluminat: pacientul ține gura larg deschisă, limba este apăsată și imobilizată cu apăsătorul de limbă. Se șterg cu tamponul ferm, fără a brusca, ambele amigdale, peretele posterior al faringelui și orice arie congestivă, cu exsudat purulent, cu false membrane sau ulceratii. Atât la introducerea cât și la retragerea tamponului



trebuie atenție pentru a nu-l atinge de limbă sau contamina cu salivă.

Exsudatul nazo-faringian se recoltează cu tamponul pe cale nazală sau pe cale bucală.

Se utilizează un tampon confecționat dintr-un aplicator de sîrmă crom-nichel cu lungimea de 20 cm și diametrul de 0,8-1 mm. Una din extremități este îndoită în buclă pentru a facilita manipularea. Cealaltă este îndoită asupra ei însăși, înmuiată în colediu și înfășurată strîns cu vată cu fibra lungă pentru a forma tamponul propriu-zis (se pot folosi și aplicatoare cu extremitatea filetată). Se sterilizează introdus într-un tub 16x160 mm.

Pentru recoltarea pe cale nazală capul pacientului este imobilizat ferm și tamponul introdus cu blîndețe de-a lungul planșeului nazal pînă atinge peretele posterior al nazo-faringelui (fig.55). Este lăsat cîteva secunde pe loc, apoi rotit ușor și retras.

Recoltarea exsudatului nazo-faringian pe cale bucală se face atunci cînd recolta pernazală nu este posibilă. Se utilizează un tampon obișnuit cu aplicator de sîrmă. Extremitatea care poartă tamponul este îndoită în unghi drept în momentul scoaterii din tub. Tamponul introdus prin gură în faringe este trecut cu atenție în spațiile uvulei și palatului moale pentru a șterge peretele posterior al nazo-faringelui (fig.55). Introducerea și scoaterea tamponului se fac cu atenție pentru a nu contamina tamponul cu secreții bucale și faringiene.

Pentru recoltarea exsudatului nazal tamponul umețat cu ser fiziologic este introdus, pe rînd, în cîte o nară pe o distanță de 2-3 cm și șterge mucoasa prin rotire blîndă.



Imediat după recoltare tampoanele sînt introduse în tub și expediate la laborator. Examinarea trebuie făcută în interval de 1 oră de la recoltare.

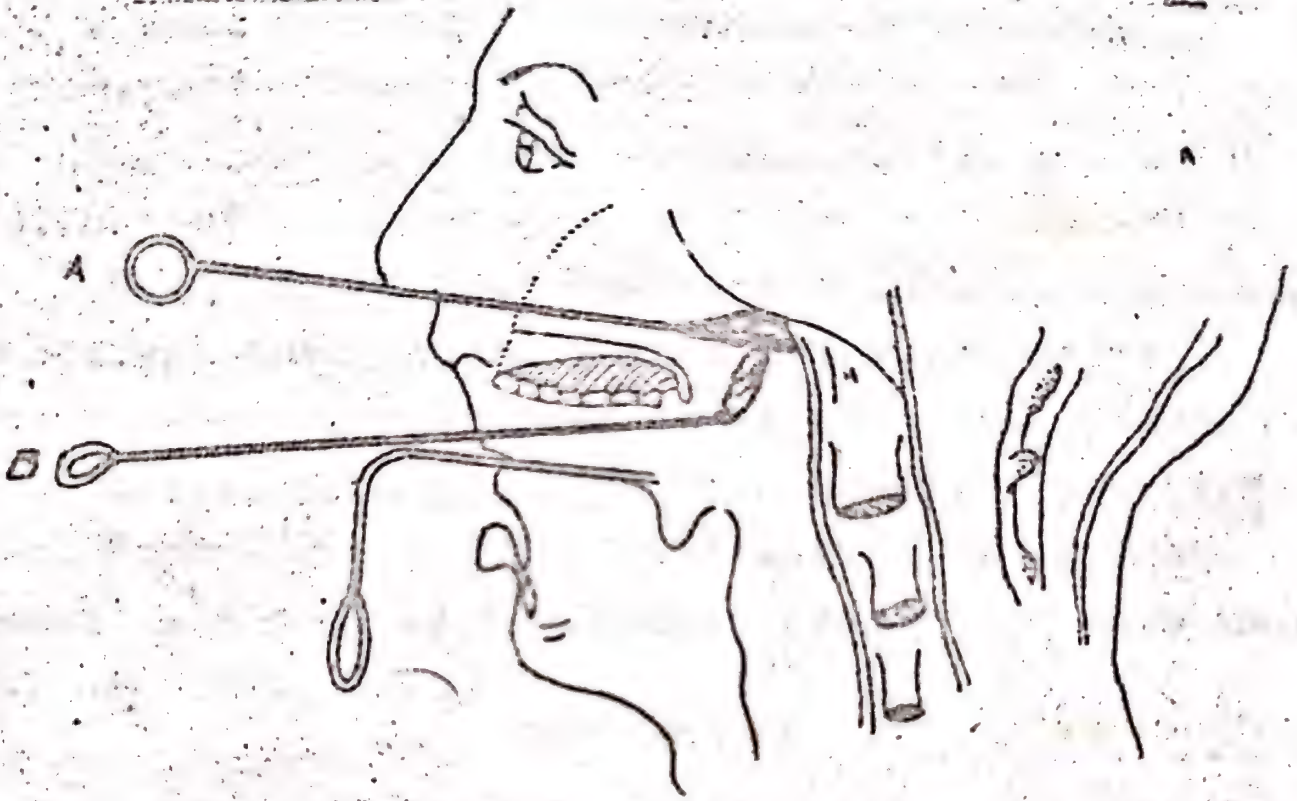


Fig.55 Recoltarea exsudatului nazo-faringian.  
A-pe cale nazală; B-pe cale bucală (schematic)

Dacă acest interval nu poate fi respectat, tamponul se introduce în mediu de transport (vezi capitolul 24, p.241). și refrigerat.

Pentru izolarea meningococilor, bacterii sensibile la rece, la deshidratare, la variațiile de pH, la concurența florei de asociație, dezideratul ma-



major este însămînțarea probelor oît mai curînd posibil după recoltare.

Buletinul de trimitere a probelor trebuie să consemneze în termeni preciși bacteria patogenă care se urmărește (streptococ  $\beta$ -hemolitic, meningococ, bacil difteric ș.a.) precum și diagnosticul clinic. Intr-un fel va fi condus examenul exsudatului faringian și nazo-faringian la un copil cu angină și în altul la un copil cu pneumonie.

Examenul bacteriologic de rutină al exsudatului faringian și nazo-faringian. Diagnosticul anginelor streptococice.

Pentru diagnosticul anginelor streptococice examenul direct microscopic al exsudatului faringian nu are nici o valoare: streptococii comensali sînt similari morfo-tinctoriali cu S.pyogenes.

### Cultura

Prima zi. Tamponul este epuizat pe o placă cu geloză-sînge<sup>1)</sup> care se incubează peste noapte la 37°C

<sup>1)</sup> Insămînțarea exsudatului faringian în placă turnată permite reperarea mai facilă a coloniilor de S.pyogenes care nu produc streptolizina S. În condiții de anaerobioză, fie și relativă, aceste tulpini formează colonii  $\beta$ -hemolitice, pe cînd după incubarea aerobă formează colonii  $\alpha$ -hemolitice sau cu hemoliză parțială.



în borcan cu luminare.

A doua zi. Se examinează cu atenție plăcile în lumină transmisă și în lumină reflectată, cu ochiul liber și cu lupa de mână.

În primul rînd se urmărește prezența și numărul coloniilor sugestive pentru streptococul  $\beta$ -hemolitic. Dacă sînt prezente, se procedează la identificarea grupului serologic (vezi capitolul 11, p. 146).

Se urmăresc apoi cantitativ coloniile comensalilor oportuniști capabili a determina infecții respiratorii (superioare sau inferioare): stafilococi aurii, H. influenzae, pneumococi, Klebsiella ș.a. Raportarea nominală a acestora se va face numai dacă numărul coloniilor respective este anormal crescut.

Pentru raportarea rezultatelor recomandăm următorii termeni:

(i) prezent streptococ  $\beta$ -hemolitic grup A (dacă s-a făcut determinarea grupului): numeroase colonii sau cîteva colonii, după caz;

(ii) floră bacteriană normală;

(iii) floră normală cu numeroase colonii de... (sau chiar cultură pură, cum este uneori în cazul stafilococului auriu)..... (urmează nominalizarea comensalului oportunist recunoscut capabil a da infecții respiratorii: stafilococ coagulazo-pozitiv, pneumococ etc.etc.).



Insistăm asupra termenului de „floră normală” și nu opinăm pentru nominalizarea speciilor respective (streptococ viridans sau streptococi  $\alpha$ -hemolitici, neisserii „nepretențioase” ș.a.) deoarece poate fi o sursă de interpretări eronate, din partea celor neavizați, dăunătoare pentru pacient.

La pacienții tratați cu antibiotice, bacilii gram-negativi, eventual stafilococii și Candida, devin predominanți. în flora mucoaselor căilor aeriene superioare. De aceea, la acești pacienți interpretarea rezultatelor examenului bacteriologic al exsudatului faringian și nazo-faringian nu poate fi făcută corect.

Pentru izolarea H.influenzae se va epuiza tamponul pe o placă cu geloză-sînge de cal sau iepure. În lipsă, se poate utiliza și geloză cu sînge de berbec cu strie de stafilococ auriu după epuizarea probei.

Pentru izolarea meningococului epuizarea tamponului nazo-faringian se va face pe placă proaspăt turnată iar pe suprafața înșămîntată se vor depune rondele cu lincomicină, colimicină sau polimixină B,

•) La pacienții cu infecții virale, ca și la indivizii normali, flora aerobă predominantă a faringelui sau naso-faringelui este reprezentată de streptococi viridans și neisserii „nepretențioase”.



antibiotice care inhibă selectiv flora de asociație. Coloniile de meningococ vor fi căutate în vecinătatea zonelor cu antibiotic. Identificarea lor se face pe baza caracterelor menționate în capitolul 12, p.157).

Meningococul este căutat în exsudatul nazo-faringian la bolnavi cu meningococemie și meningită cerebro-spinală epidemică ca și pentru depistarea purtătorilor sănătoși.

#### Confirmarea bacteriologică a anginei difterice

Diagnosticul clinic este cel care dictează terapia specifică în difterie. Laboratorul de bacteriologie nu face decât să confirme sau să infirme acest diagnostic într-un interval în care actul terapeutic este deja consumat.

Se recoltează 2 tamponane de la nivelul falsei membrane.

Prima zi. Unul din tamponane se însămânțează pe o placă cu mediu Tinsdale (mediu selectiv cu telurit de potasiu) și pe o placă cu geloză sînge.

Însămânțarea pe geloză sînge se impune din 2 motive:

- Controlează calitatea recoltei. Dacă pe mediu selectiv nu apare cultura nu se poate ști dacă aceasta se datorează absenței patogenilor sau absenței bacteriilor ca urmare a unei recolte necorespunzătoare. Dacă lipsește cultura și pe placa cu geloză sînge, atunci recolta este necorespunzătoare.

- Unele angine cu S.pyogenes pot simula difteria. În acest caz placa cu geloză sînge lămurește diagnosticul, ceea ce nu poate să facă mediul selectiv cu telurit de potasiu.

După însămânțarea plăcilor tamponul poate fi folosit pentru efectuarea unui frotiu care se examinează după colorarea cu albastru de metilen. Are numai valoare prezumtivă,



deoarece morfologic bacilul difteric nu poate fi diferențiat cu certitudine de bacilii difterimorfi normal prezenți la acest nivel.

Al doilea tampon este însămânțat în mediu de îmbogățire OCST (ou-cistină-telurit de potasiu).

Mediile însămânțate se incubează peste noapte la 37°C.

A doua zi.

Pe mediul Tinsdale

- sînt prezente colonii negre cu halou negru. Coloniiile suspecte sînt repicate pe mediu Loeffler și într-un tub cu bulion infuzie. În seara aceleiași zile poate fi făcut un frotiu din cultura pe mediu Loeffler.

- Coloniiile negre cu halou negru lipsesc. Se reincubează plăcile pentru alte 24 ore. Se face repicarea de pe mediul de îmbogățire pe mediul Tinsdale și se urmărește în același mod.

A treia zi. Se controlează microscopic puritatea culturii pe mediul Loeffler și se repică pe mediul Ries pentru cercetarea reacțiilor fermentative.

A patra zi. Dacă frotiul a atestat puritatea culturii iar reacțiile fermentative prezenta bacilului difteric, se procedează la testarea toxigenezii *i n v i v o* folosind cultura de 48 ore în bulion infuzie (vezi capitolul 16, pp. 193-195) sau *i n v i t r o* folosind cultura pe mediul Loeffler (vezi capitolul 6, pp. 89-90).

### Diagnosticul infecției Vincent

Această infecție evoluează cu leziuni pseudo-membranoase sau ulcero-necrotice la nivelul gurii sau faringelui. Este determinată de o asociație sinergică între Borrelia vincenti și Fusobacterium fusiforme, un bacil anaerob, gram-negativ, cu capetele efilate.

Cu tamponul recoltat la nivelul leziunii se efectuează un frotiu care se colorează gram. B.vincenti și F.fusiforme sînt prezenți și în gura indi-



vizilor normali. De aceea, prezența în frotiu a numeroase spirochete și bacili fuziformi gram-negativi are valoare diagnostică numai în contextul clinic sugestiv pentru angina sau stomatita Vincent.

./.



### 31 DIAGNOSTICUL BACTERIOLOGIC AL INFECTIILOR CAILOR RESPIRATORII INFERIOARE. EXAMENUL BACTERIOLOGIC AL SPUTEI.

Infecțiile căilor respiratorii inferioare sînt determinate de virusuri, bacterii, fungi sau protozoare. Infecția bacteriană evoluează frecvent ca o complicație a infecțiilor virale.

Cînd focarul infecțios evoluează în lumenul bronșic sau alveolar (bronșite acute, pneumonii și bronho-pneumonii) microbul infectant este prezent și poate fi evidențiat în exsudatul bronșic.

În cazul focarelor infecțioase cu evoluție interstițială (tuberculoză pulmonară, abcese pulmonare), microbul infectant apare în secreția bronșică numai după deschiderea focarului infecțios în lumenul bronșic.

Pnemoniile bacteriene acute sînt infecții bacteriemice: bacteria infectantă poate fi izolată în hemocultură în cursul primelor zile de boală. - Persistența hemoculturilor pozitive pe parcursul evoluției pneumoniei indică un prognostic grav. - Pnemoniile se pot complica cu empieme pleurale: bacteria infectantă este prezentă și poate fi evidențiată în exsudatul pleural.



Sputa este reprezentată de secrețiile traheo-bronșice expectorate în cursul unui acces de tuse.

Acumularea de secreții bronșice și expectorația nu sînt apanajul exclusiv al infecțiilor bronho-pulmonare. Ele apar și în alte circumstanțe patologice:

- (i) afecțiuni alergice ale căilor respiratorii,
- (ii) inhalare cronică de gaze iritante, pulberi, fumat ș.a.

Mucoasa bronșică normală este sterilă.

Sputa însă este un produs patologic care se contaminează întotdeauna cu microbiota gîtului (nazo-faringe, faringe, tonsile) și gurii (cavitatea bucală, dinții, limba, gingiile, saliva) (fig. 54).

Nici aspirația prin bronhoscop nu protejează exsudatul bronșic de contaminarea cu flora cavității nazale și faringelui.

Numai aspirația traheo-bronșică prin punctie subglotică furnizează un eșantion de secreție bronșică necontaminat.

Flora de contaminare normală a sputei include constant:

Streptococi viridans,

Neisseria „nepretentioasă”,

Branhamella catarrhalis,

Stafilococi;



variabil și în cantități reduse:

Pneumococi (de obicei R - cca 25% din indivizii normali sînt purtători bucali sau faringieni),

Haemophilus influenzae, H. parainfluenzae, H. haemolyticus, H. parahaemolyticus,

Streptococcus pyogenes (cca 5-20% din indivizii normali sînt purtători faringieni) și streptococi  $\beta$ -hemolitici grup C,

Enterococi,

Enterobacteriaceae (cel mai frecvent Escherichia coli și Klebsiella),

Candida albicans,

Anaerobi nesporulați (coci gram-pozitivi și negativi, bacili gram-pozitivi și negativi, spirili).

La pacienții tratați cu antibiotice contaminarea sputei cu bacili gram-negativi, stafilococ auriu și C. albicans poate să fie mai importantă ca urmare a predominanței acestor bacterii pe mucoasa căilor respiratorii superioare.

Infecțiile bronho-pulmonare bacteriene sînt cauzate

(i) cel mai frecvent de saprofizi și comensali oportuniști ai căilor aeriene superioare

— Pneumococi,

— Escherichia coli,

— Klebsiella pneumoniae,

— Proteus,

— H. influenzae,

— Pseudomonas aeruginosa,

— Staphylococcus aureus,

— Mycoplasma pneumoniae ș.a.



(ii) mai rar de bacterii patogene

- pentru care există purtători sănătoși nazo-faringieni (contaminanți virtuali ai probelor de spută):

Streptococcus pyogenes

- pentru care nu există purtători sănătoși,

Bordetella pertussis,

Mycobacterium tuberculosis,

foarte rar

Bacillus anthracis,

Yersinia pestis ș.a.

Pentru diagnosticul etiologic al infecțiilor bronho-pulmonare trebuie examinat bacteriologic exsudatul bronsic.

În pneumoniile bacteriene acute hemocultura practică în primele zile de boală este foarte utilă.<sup>\*)</sup> De asemenea, examenul bacteriologic al exsudatului pleural dacă acesta există.

Recoltarea și transportul probelor

Recoltarea probelor pentru diagnosticul infecțiilor căilor respiratorii inferioare trebuie făcută înainte administrării tratamentului antimicrobian.

<sup>\*)</sup> La 25-30% din pacienții cu pneumonie pneumococică, pneumococul este izolat în hemocultură. La mulți pacienți pneumococul a fost izolat din sânge și nu a putut fi izolat din spută.



### Recoltarea sputei

Este esențial ca proba recoltată să conțină exsudat traheo-bronșic și nu numai salivă sau salivă și mucus nazo-faringian. Pentru aceasta trebuie să se asigure cooperarea bolnavului instruit odată cu înmînarea vasului pentru recoltă. Prea des încă sora lasă la capul bolnavului borcanul și se rezumă să-i spună „scuipă după ce tușești” fără a-i explica ce înseamnă a expectora sau ce înseamnă sputa.

Se folosesc borcane sterile de 100-500 ml.

O probă de 1-3 ml este suficientă.

Pentru a reduce contaminarea probei, recoltarea trebuie să se facă după clătirea gurii și gargară cu apă fiartă și răcită.

La pacienții cu tuse productivă, care expectorează cantități apreciabile, este suficientă recoltata după un acces de tuse. Cel mai indicat este ca acești pacienți să expectoreze în fața medicului sau a sorei.

La pacienții cu tuse slab productivă contaminarea probei este considerabilă. Proba se recoltează dimineața la deșteptare (exsudatul bronșic acumulat peste noapte). La acești pacienți se poate încerca stimularea secrețiilor bronșice prin aerosolizare cu soluție salină hipertonică caldă.)

\*) In aceste cazuri o atenție deosebită trebuie dată sterilizării aparaturii de aerosolizare pentru a evita infecțiile iatrogene.



La copii, care nu expectorează, se încearcă recoltarea unei probe de exsudat nazo-faringian (vezi capitolul 30, p.300 și 303 și în capitolul de față p. 317). Această probă reflectă însă și mai puțin fidel decât sputa flora secrețiilor bronșice. Rezultate mai bune dă recoltarea pe tampon laringian a exsudatului bronșic proiectat în cursul tusei pînă la acest nivel.

Tamponul laringian este confecționat dintr-un aplicator de sîrmă de aluminiu cu diametrul de 2 mm, curbat în unghi de  $120^\circ$  la 4-5 cm de extremitatea care suportă tamponul. Se sterilizează introdus într-un tub de  $18 \times 30$  mm. Pentru recoltare: se umețează tamponul cu apă peptonată; limba este imobilizată cu apăsătorul de limbă; sub controlul oglinzii laringiene tamponul este introdus peste baza limbii. Cînd partea lungă a aplicatorului stă de-a lungul limbii, tamponul este în laringe. Dacă în acest moment pacientul este stimulat să tusească, secreții din trahee și laringe se depun pe tampon.

La bolnavii inconștienți sau cu dureri toracice mari, care nu tuseau se recurge la aspirarea secrețiilor bronșice cu un cateter cu diametru redus introdus printr-un ac cu care s-a puncționat ligamentul cricoidian.

Pentru diagnosticul cazurilor suspecte de tuse convulsivă se recurge la examenul exsudatului nazo-faringian. Tamponul introdus în nazo-faringe pe cale nazală este lăsat pe loc pe parcursul cîtorva accese de tuse provocată.

La pacienții la care nu se reușește recoltarea pe tampon se plasează la 10 cm de gură o placă cu mediu Bordet-Gengou descoperită în cursul unui acces de tuse. Rezultatele sînt mai slabe decît în cazul recoltării pe tampon.



La copii, care nu expectorează, se încearcă recoltarea unei probe de exsudat nazo-faringian (vezi capitolul 30, p.300 și 303 și în capitolul de față p. 317). Această probă reflectă însă și mai puțin fidel decât sputa flora secrețiilor bronșice. Rezultate mai bune dă recoltarea pe tampon laringian a exsudatului bronșic proiectat în cursul tușei pînă la acest nivel.

Tamponul laringian este confecționat dintr-un aplicator de sîrmă de aluminiu cu diametrul de 2 mm, curbat în unghi de  $120^\circ$  la 4-5 cm de extremitatea care suportă tamponul. Se sterilizează introdus într-un tub de  $18 \times 30$  mm. Pentru recoltare: se umețează tamponul cu apă peptonată; limba este imobilizată cu apăsătorul de limbă; sub controlul oglinzii laringiene tamponul este introdus peste baza limbii. Cînd partea lungă a aplicatorului stă de-a lungul limbii, tamponul este în laringe. Dacă în acest moment pacientul este stimulat să tușească, secreții din trahee și laringe se depun pe tampon.

La bolnavii inconștienți sau cu dureri toracice mari, care nu tușesc se recurge la aspirarea secrețiilor bronșice cu un cateter cu diametru redus introdus printr-un ac cu care s-a punctat ligamentul cricoidian.

Pentru diagnosticul cazurilor suspecte de tuse convulsivă se recurge la examenul exsudatului nazo-faringian. Tamponul introdus în nazo-faringe pe cale nazală este lăsat pe loc pe parcursul cîtorva accese de tuse provocată.

La pacienții la care nu se reușește recoltarea pe tampon se plasează la 10 cm de gură o placă cu mediu Bordet-Gengou descoperită în cursul unui acces de tuse. Rezultatele sînt mai slabe decît în cazul recoltării pe tampon.



Pentru diagnosticul bacteriologic al tuberculozei pulmonare se recoltează cîte o probă de spută matinală în 3 zile consecutiv. Probele se trimit laboratorului imediat după recoltare.

La pacienții care nu expectorează (copii ș.a.), se recoltează cîte un tampon laringian în 3 zile consecutiv sau, în condiții de spitalizare, se recoltează spălătura gastrică\*.)

La pacienții cu tuse slab productivă se poate încerca stimularea secrețiilor bronșice prin aerosolizare cu soluție hipertonică de NaCl (vezi p.315).

Flora exsudatului bronșic este reflectată cel mai fidel de aspiratul traheal prin puncție sublaringiană. Probele supuse hazardului contaminării cu microbiota căilor aeriene superioare - sputa, aspiratul traheo-bronșic pe cale nazală sau bucală ș.a. - reflectă mai puțin fidel flora exsudatului bronșic. Sputa o reflectă cu atît mai puțin fidel cu cît tusea este mai slab productivă. Cel mai puțin fidel este reflectată de tampo-nul nazo-faringian recoltat la copii în lipsa sputei.

Probele de spută trebuie transportate, imediat după recoltare, la laborator unde sînt examinate fără întîrziere.

Mentînerea la temperatura camerei determină

\*.) Produsul de spălătură gastrică trebuie neutralizat imediat cu sol.10% carbonat de sodiu în prezența unui indicator de pH.



modificări ale raporturilor cantitative dintre bacteriile probei prin multiplicarea saprofiților de contaminare.

Refrigerarea, dacă depășește 1-3 ore, devine nocivă pentru unele dintre bacteriile infectante (H. influenzae ș.a.)

Examenul bacteriologic de rutină al sputei

Decontaminarea = îndepărtarea excesului de salivă din probă. Se face prin spălare în ser fiziologic a unui fragment purulent din spută.

În cutii Petri, se pregătesc 3 băi cu minimum 10-15 ml ser fiziologic steril fiecare.

Se prelevă din probă un fragment purulent, mucopurulent sau sanguinolent (în funcție de aspectul sputei) și se spală succesiv în cele 3 băi, câte un minut în fiecare baie. Manipularea se face cu o pipetă Pasteur boantă și cu ansa cu fir gros.

Omogenizarea = asigură repartiția uniformă a microbului infectant în eșantionul examinat microscopic și în cel cultivat.

Din ultima baie de spălare, fragmentul purulent este trecut într-o cutie Petri separată unde, într-o mică cantitate de ser fiziologic, cu o seringă proba este omogenizată prin aspirări și respingeri repetate.

Examenul direct microscopic

Din proba decontaminată și omogenizată se efectuează 3 frotiuri care se colorează:

- cu albastru de metilen sau, mai bine, May-Grünwald-Giemsa pentru urmărirea reacției celulare;



- Gram pentru urmărirea bacteriilor;
- Ziehl-Neelsen pentru urmărirea bacililor acido-rezistenți.

Prezența pe frotiul din spută a polinuclearelor și macrofagelor certifică existența exsudatului bronho-pulmonar în proba examinată.

Prezența pe frotiu a celulelor epiteliale scuamoase indică contaminarea probei de spută cu secreții bucale.

Chiar în prezența polinuclearelor și macrofagelor, cu cît numărul celulelor epiteliale scuamoase este mai mare cu atît proba de spută este mai puțin reprezentativă.

Prezența pe frotiul din spută a unui mare număr de cozinofile indică existența unui proces alergic bronho-pulmonar.

Exceptînd prezența pe frotiul din spută

- numeroși coci ovalari, gram-pozitivi, capsulați, așezați în perechi sau scurte lanțuri (sugestivi pentru o pneumonie pneumococică),
- numeroși bacili scurți, groși, gram-negativi, capsulați (sugestivi pentru o pneumonie cu Klebsiella)

prezența altor bacterii, chiar în număr mare, este greu de interpretat.

Si într-o spută contaminată cu salivă frotiul evidențiază numeroase bacterii, dar acestea, variate ca formă și afinitate tinctorială, sînt masate evident pe fondul celulelor scuamoase de contaminare bu-



cală (în special ooni ovalari, gram-pozitivi necapsulați, așezați în perechi și lanțuri).

Probele pentru care examenul direct microscopio semnaleză o contaminare masivă cu secreții bucale sau exclusiv secreții bucale nu se examinează în continuare.

### Sputocultura

Prima zi. Din proba decontaminată și omogenizată, se epuizează o ansă pe o placă cu geloză-sînge. Epuizarea se face în 4 arii succesive (fig.56). Pe aceeași placă, peste ariile de epuizare a probei se însămînțează 4 striuri de stafilococ auriu pentru a facilita izolarea și identificarea *H.influenzae*. De asemenea, se depun 2 rondela de hîrtie de filtru impregnate cu optochin pentru diferențierea prezumtivă a pneumococului infectant de streptococi α-hemolitici de contaminare (fig.56).

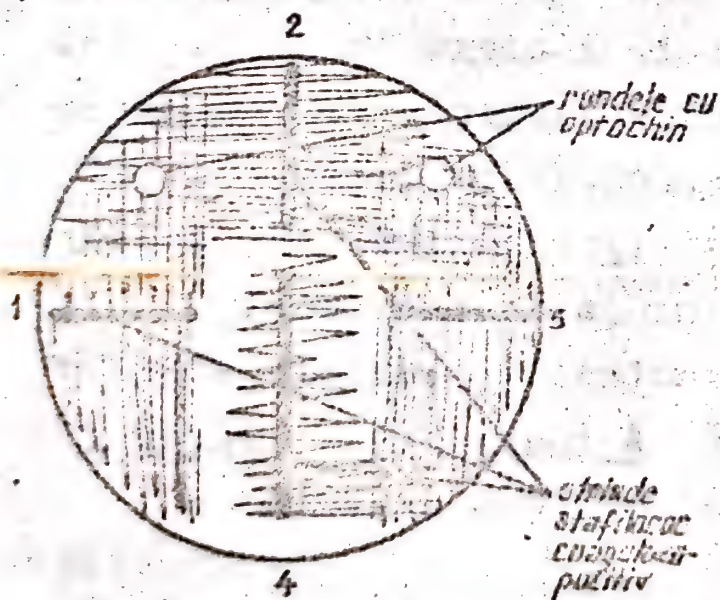


Fig.56 Sputocultura: modul în care se epuizează inoculum

Se incubează, în borcan cu lumînare, peste noapte la 37°C.

Probele de spută de la bolnavi cu supurații pulmonare sînt cultivate și în anaerobioză.

A doua zi. Se procedează la identificarea coloniilor care sînt sugestive pentru principalele bac-

terii ce pot da infecții bronho-pulmonare



și predomină cantitativ în cultură (prezente în ultimile arii de epuizare a probei).

Dacă izolatul predominant și în cantitate mare este pneumococul, Klebsiella friedländeri, H.influenzae, stafilococul auriu sau alt oportunist capabil a da infecții bronho-pulmonare poate fi implicat în etiologia infecției investigate. I se face antibiograma.

Prezența în cantitate mică și în cultură mixtă a pneumococului, Kl.friedländeri, H.influenzae, a stafilococului auriu sau a altor oportuniști capabili a da infecții bronho-pulmonare face dubioasă implicarea lor etiologică. În asemenea situații, dacă proba a fost într-adevăr recoltată înaintea administrării tratamentului antimicrobian, pot fi în cauză etiologia virală, Mycoplasma pneumoniae ș.a.

Izolarea din probă, indiferent de cantitate, a unei bacterii patogene cunoscută a da infecții bronho-pulmonare (Mycobacterium tuberculosis ș.a.) obligă la implicarea etiologică.

#### Inocularea la șoarece

Dacă frotiul gram este sugestiv pentru prezența pneumococului sau Kl.friedländeri, proba poate fi inoculată sub-cutan la șoarece în vederea izolării acestor bacterii (vezi capitolele 11 și 13, p.148 și p.167).



32 DIAGNOSTICUL BACTERIOLOGIC AL INFECTIILOR  
INTESTINALE SI TOXIINFECTIILOR ALIMENTARE.  
EXAMENUL BACTERIOLOGIC AL MATERIILOR  
FECAL.

În etiologia infecțiilor intestinale bacteriile au cea mai însemnată pondere; virusurile și protozoarele sînt mai rar implicate.

(i) Infecțiile intestinale cu bacterii patogene cu rol etiologic bine precizat - Salmonella, Shigella, Vibrio cholerae - sînt în general ușor de recunoscut. Evidențierea acestor bacterii într-o probă de scaun diareic obligă la implicarea lor etiologică.

Infecțiile inițiate de Salmonella la nivelul intestinului pot să evolueze localizate la acest nivel sau să se extindă și la alte organe. Se realizează astfel tablouri clinice variate:

- (gastro)enterocolite, frecvent expresia clinică a unor toxiinfecții alimentare,

- febre enterice, infecții generalizate cu evoluție ciclică și leziuni intestinale tipice (S.typhi, S.paratyphi A, B sau C),

- infecții septicemice cu sau fără localizări secundare.

Variatele tipuri de Shigella determină dizenteria bacilară.

V.cholerae determină holera, o enterită acută cu evoluție foarte gravă.



(ii) Infecțiile intestinale cu bacterii condiționat patogene, oportuniste, sînt mai dificil de diagnosticat. Implicarea lor etiologică trebuie judecată în funcție de circumstanțele apariției îmbolnăvirii.

În diareea epidemică a nou născutului rolul etiologic al tulpinilor enteropatogene de Escherichia coli este bine precizat. Dintre acestea, Esch. coli  $O_{124}B_{17}$  poate determina și enterocolite ale adultului.

Staphylococcus aureus și Candida albicans pot să realizeze enterocolite pseudomembranoase postantibiotice.

Un număr relativ redus de enterocolite sînt determinate de Yersinia enterocolitica.

La pacienți cu apărarea antiinfecțioasă deficitară (nou născuți, prematuri, bolnavi cu neoplazii ș.a.) diarei acute pot fi asociate cu Klebsiella, Proteus, Pseudomonas aeruginosa ș.a.

Toxiinfecții alimentare pot apare ca urmare a consumului de alimente în care s-au multiplicat excesiv salmonelle ș.a. sau în care s-au multiplicat și au elaborat entero(neurotoxine) stafilococi, Clostridium botulinum.

Pentru diagnosticul etiologic al enterocolitelor se examinează probe de materii fecale



Pentru diagnosticul etiologic al febrei enterice se examinează în afară de materiile fecale și produse alese în funcție de stadiul evolutiv al bolii: sânge, măduva osoasă, urina, bila.

Pentru diagnosticul toxiinfecțiilor alimentare se examinează probe de alimente, vărsături, materii fecale.

### Materiile fecale și condiția lor bacteriologică

Normal, materiile fecale conțin un număr considerabil de bacterii aparținând unor diverse specii saprofite sau comensale, aerobe și anaerobe: nepatogene (specii de Lactobacillus) sau oportuniste cu potențial variabil de patogenitate (bacili coliformi, specii de Proteus, stafilococi, inclusiv stafilococi coagulazo-pozitivi, enterococi, peptostreptococi, specii de Bacteroides, Clostridium ș.a)

Raporturile cantitative între aceste numeroase specii sînt influențate de dietă ca și de desfășurarea normală sau anormală a proceselor de digestie.

### Recoltarea și transportul probelor

Probele de materii fecale pentru diagnosticul infecțiilor intestinale sau al purtătorilor de enterobacterii patogene se recoltează înaintea administrării oricărui tratament antimicrobian.

Probele se recoltează din scaun ca atare sau



direct din rect cu sonda Nelaton ori cu tamponul.

(i) Recoltarea probelor din scaun. Bolnavul defecă într-un vas (bazinet, oală de noapte) curat, fără urme de antiseptic, sterilizat prin fierbere. La nou născut și sugar probele se recoltează din scaunul de pe pelinca în prealabil sterilizată.

Se urmăresc și se prelevă, dacă există, fragmente muco-sanguinolente, muco-purulente, granulații riziforme etc. Recoltarea se face cu ajutorul

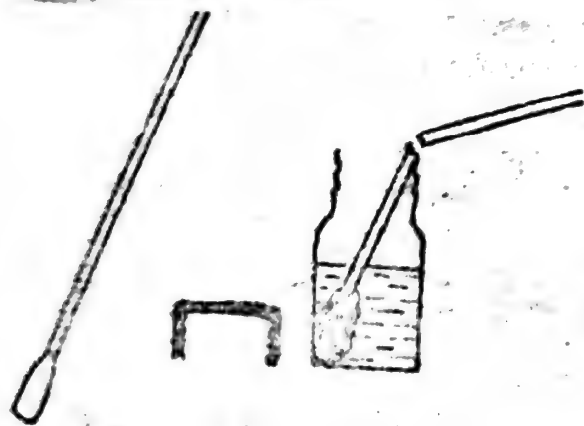


Fig.57 Model de spatulă și recoltor pentru materii fecale

unei mici spatule de lemn sterile. Proba, în cantitate de cca 1 g, se suspensionează în 3-4 ml ser fiziologic sau mediu de transport într-un flacon steril, cu gura largă, prevăzut cu dop de bumbac sau mai bine cu capac cu

ghivent (fig.57).

(ii) Recoltarea direct din rect se face cu tamponul sau cu sonda Nelaton.

Sonda Nelaton se introduce în rect pe o distanță de cca 15 cm la adult și corespunzător mai puțin la copil. După recoltarea probei, sonda se descarcă prin agitare într-un flaconaș cu ser fiziologic sau mediu de transport.

În cazurile de dizenterie cronică se recomandă recoltarea cu tamponul, în cursul proctoscopiei,



direct din rect cu sonda Nelaton ori cu tamponul.

(i) Recoltarea probelor din scaun. Bolnavul defecă într-un vas (bazineț, oală de noapte) curat, fără urme de antiseptic, sterilizat prin fierbere. La nou născut și sugar probele se recoltează din scaunul de pe pelinca în prealabil sterilizată.

Se urmăresc și se prelevă, dacă există, fragmente muco-sanguinolente, muco-purulente, granulații riziforme etc. Recoltarea se face cu ajutorul

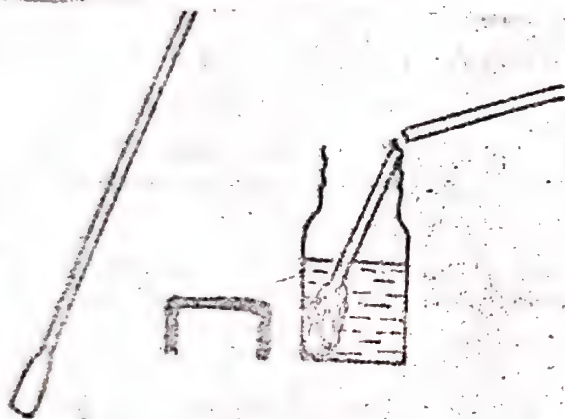


Fig.57 Model de spatulă și recoltor pentru materii fecale

unei mici spatule de lemn sterile. Proba, în cantitate de cca 1 g, se suspensionează în 3-4 ml ser fiziologic sau mediu de transport într-un flacon steril, cu gura largă, prevăzut cu dop de bumbac sau mai bine cu capac cu

ghiveț (fig.57).

(ii) Recoltarea direct din rect se face cu tamponul sau cu sonda Nelaton.

Sonda Nelaton se introduce în rect pe o distanță de cca 15 cm la adult și corespunzător mai puțin la copil. După recoltarea probei, sonda se deșterdă prin agitare într-un flaconaș cu ser fiziologic sau mediu de transport.

În cazurile de dizenterie cronică se recomandă recoltarea cu tamponul, în cursul proctoscopiei,



direct de la nivelul ulcerățiilor mucoasei.

În izbucnirile epidemice de enterocolită recoltarea probelor din scaun este dificil de realizat. În aceste circumstanțe recoltarea pe tampon sau sondă Nelaton direct din rect dă rezultate tot atât de bune.

Pentru examinări la convalescenți sau pentru depistarea purtătorilor de enterobacterii patogene este mai indicată recoltarea probelor din scaun decât recoltarea pe tampon<sup>\*)</sup>. Recoltarea se face, după purgare (numai pentru depistarea purtătorilor), din ultimile fracțiuni ale scaunului.

Sansele de izolare a unor patogeni cum sînt Salmonella și Shigella sau a tulpinilor enteropato-gene de Esch.coli cresc dacă se examinează probe multiple recoltate de la același pacient în cursul stadiului acut al bolii diareice (primele 3 zile) cînd aceste organisme se află prezente în număr mare în intestin.

Probele trebuie examinate cît mai curînd posibil după recoltare. Shigellele sînt deosebit de sensibile la antagonismul exercitat de flora de contaminare a fecalelor. Rata de supraviețuire a salmonellectelor este mai mare, mai ales dacă se re-

---

<sup>\*)</sup> La convalescent sau purtătorul sănătos bacteriile patogene se află în număr redus în materiile fecale. Dacă pe tampon se recoltează o probă de aproximativ 100 mg și în materiile fecale patogenul este în cantitate mai mică de 10.000/g, se înțelege că șansa de izolare din asemenea probă este redusă.



curge la medii de transport și refrigerare.

### Examenul bacteriologic al materiilor fecale

Examenul direct microscopic al materiilor fecale este inutil. Este indicat numai în cazul particular al probelor de la pacienți cu enterocolită postantibiotice (vezi p. 330).

(i) Izolarea patogenilor din materii fecale se face pe medii selective adecvate pentru fiecare din aceste bacterii.

#### Salmonella și Shigella

Prima zi. Se însămânțează în paralel o placă cu mediu selectiv și un tub cu mediu de îmbogățire. Se incubează peste noapte la 37°C.

Mediile slab selective și diferențiale: Mac Conkey, Leifson ș.a. inhibă majoritatea bacteriilor gram-pozitiv și permit izolarea bacililor gram-negativi. Aceștia pe care îi diferențiază în lactozo-pozitivi și lactozo-negativi. Sînt convenabile pentru izolarea shigellelor, organisme cu vitalitate mai redusă, care pe medii mai selective pot fi inhibate.

Medii moderat selective și diferențiale: mediul SS (Salmonella-Shigella), mediul cu dezoxicholat-citrat ș.a. Sînt convenabile pentru izolarea salmonellelor. Prin conținutul lor în săruri biliare, verde brillant și citrat sînt mai puțin convenabile pentru unele specii de Shigella mai sensibile.

Mediile puternic selective, cum este mediul Wilson-Blaire cu sulfat de bismut, sînt indicate pentru izolarea salmonellelor, în special S.typhi.



Mediile de îmbogățire, cum sînt bulionul cu selenit sau bulionul cu tetracionat, inhibă dezvoltarea bacteriilor gram-pozitive și limitează pentru o perioadă scurtă (12-18 ore) multiplicarea coliformilor și a speciilor de Proteus favorizînd în același timp multiplicarea salmonelilor și shigellelor.

A doua zi. Se cercetează prezența coloniilor lactozo-negative.

- Coloniile lactozo-negative sînt absente. Se face o repicare din mediu de îmbogățire<sup>\*)</sup> pe mediu selectiv și se incubează peste noapte la 37°C.

- Coloniile lactozo-negative sînt prezente. Se repică<sup>\*)</sup>, pentru triajul biochimic (mediu Hajna, mediu pentru urează și mobilitate) și pentru verificarea purității culturii (mediu Drigalski), cîte o colonie lactozo-negativă din fiecare tip prezent (vezi capitolul 13, pp.162-164).

A treia zi. Se recurge la identificarea antigenică și biochimică completă a tulpinilor pentru care testele de triaj sugerează o Salmonella sau o Shigella (vezi capitolul 13, pp.169-173).

---

<sup>\*)</sup> In vederea repicării:

- Nu se va răci ansa atîngînd cu ea suprafața mediului selectiv. Pe suprafața mediului pot fi prezente bacterii inhibate, care își pot relua dezvoltarea pe mediile de triaj biochimic sau diferențiale.

- Prelevarea cu ansa se face atîngînd ușor numai suprafața coloniei în centrul ei. În profunzime pot exista bacterii de contaminare inhibate.



(ii) Izolarea condiționat patogenilor din scaunul diareic se face pe medii diferențiale neselective, care permit evidențierea fidelă a organismelor predominante.

Izolarea tulpinilor enteropatogene de Escherichia coli (urmărite sistematic în enterocolitele copilului sub 2 ani).

Prima zi. Proba se epuizează pe un mediu diferențial lactozat\*) (mediul Mac Conkey, EMB sau Drigalski). Se incubează peste noapte la 37°C.

A doua zi. Prin reacții de aglutinare pe lamă cu ser polivalent se reperează coloniile de Esch.coli posibil enteropatogene.

A treia zi. Se continuă identificarea prin reacții de aglutinare cu seruri monovalente (vezi capitolul 13, pp.164-165; capitolul 6, pp.91-96).

Pentru detectarea tulpinilor enteropatogene de Esch.coli, colorarea cu anticorpi fluorescenți a frotiului din materii fecale este o metodă mai rapidă și mai sensibilă decât izolarea.

Trebuie reținut faptul că enteritele nou născutului și sugarului pot fi determinate și de alte bacterii patogene sau condiționat patogene. De aceea,

\*) Unele tulpini enteropatogene de Esch.coli nu pot fi izolate pe mediul MacConkey dar cresc foarte bine pe geloză-sînge. De aceea, epuizarea probei și pe o placă cu geloză sînge este o precauție necesară.



probele de materii fecale diareice de la copilul sub 2 ani, ca și cele de la copilul mare sau adult, se vor epuiza în paralel și pe medii selective.

Examenul materiilor fecale la pacienții cu enterocolită postantibiotice

Examenul direct microscopic poate aduce date utile.

Dacă este în cauză stafilococul, frotiul va evidenția predominanța netă a cociilor gram-pozitivi în grămezi, ceea ce nu se întâmplă în alte situații.

Dacă este în cauză Candida albicans, frotiul va evidenția numeroase elemente miceliene și levuriforme (Candida saprofită prezintă numai elemente levuriforme).

Semnificația izolării stafilococilor coagulazopozitivi din probe de materii fecale

De la 10-20% din indivizii normali se izolează din materiile fecale stafilococi coagulazopozitivi. Această proporție crește considerabil la pacienții spitalizați și în special după administrarea de antibiotice. Asemenea pacienți purtători intestinali de stafilococi coagulazopozitivi pot să facă enterocolite cu totul alte etiologii decât cea stafilococică.

Simpla prezentă într-o probă de scaun diareic a stafilococilor coagulazopozitivi nu semnifică obligator implicarea lor etiologică.



Pentru a fi implicați în etiologia unei enterocolite postantibiotice, stafilococi coagulazo-pozitivi trebuie să fie floră predominantă în proba de scaun diareic.

Această predominanță poate fi demonstrată numai prin examen direct microscopic coroborat cu rezultatele izolării pe geloză sînge<sup>\*)</sup>, mediu neselectiv<sup>\*\*)</sup> care nu perturbă raporturile cantitative dintre bacteriile probei.

La un bolnav cu enterocolită postantibiotice predominanța în frotiul din scaunul diareic a cocilor gram-pozitivi în grămezi și predominanța pe placa cu geloză-sînge, pe care s-a epuizat proba, a colonilor de stafilococi coagulazo-pozitiv pune diagnosticul de enterocolită stafilococică postantibiotice.

Dacă investigația bacteriologică a unei probe de scaun diareic nu a putut dovedi ca agent etiologic o bacterie patogenă (Shigella, Salmonella ș.a.), Escherichia coli enteropatogenă, trebuie

<sup>\*)</sup> Pentru a preveni invadarea plăcilor cu Proteus, în aceste situații, se adaugă la mediu phenylethanol sau se recurge la o geloză cu concentrație mai mare de agar (4% în loc de 2%).

<sup>\*\*) Izolarea stafilococilor coagulazo-pozitivi pe medii selective hiperclorurate (mediu Chapman ș.a.) nu poate demonstra prezența lor predominantă într-o probă de scaun. De aceea nu opinăm pentru utilizarea unor asemenea medii care, în mîna celor neavizați, pot duce la rezultate eronate.</sup>



investigată intervenția posibilă a unui saprofit oportunist (Nebsiella, Proteus, Ps.pyocyanea). Implicarea acestora poate fi făcută pe baza criteriului cantitativ: predominanța lor în cultura pe medii neselective. Dar la pacienții care au primit antibiotice nici acest criteriu nu este suficient din cauza dezechilibrului creat de antibiotice în microbiota intestinului, dezechilibru care nu duce obligator la enterocolită.

Pentru confirmarea sau infirmarea rolului etiologic al bacteriei anormal predominantă cantitativ, se poate recurge la autoserodiagnostic. Auto-serodiagnosticul are însă dezavantajul confirmării tardive a diagnosticului.

Privitor la evidențierea și identificarea bacteriilor sau/și toxinelor lor în probe de alimente, vărsături și materii fecale din izbucniri epidemice de toxiinfecții alimentare se vor consulta capitolele 10, 13, 16.

#### In concluzie

Pentru diagnosticul bacteriologic al unei enterocolite probele de scaun diareic vor fi epuizate în paralel pe

- medii selective adecvate pentru izolarea patogenilor (Salmonella, Shigella ș.a.)
- medii diferențiale, neselective, pentru izolarea tulpinilor enteropatogene de Escherichia coli și pentru a urmări raporturile cantitative dintre saprofiții condiționat patogeni.



### 33 DIAGNOSTICUL BACTERIOLOGIC AL INFECTIILOR CAILOR GENITALE LA FEMEIE

Mucoasa căilor genitale la femeie cuprinde 2 zone distincte:

- o zonă contaminată: vulvă, vagin, exocol;
- o zonă normal sterilă: uter, trompe, endocolul fiind zonă de tranziție.

Flora normală a zonei contaminate este reprezentată de:

Lactobacili,  
Bacili coliformi,  
Specii de Bacteroides și alți bacili anaerobi nesporulați,  
Coci gram-pozitivi și gram-negativi: stafilococi, enterococi și alți streptococi aerobi și anaerobi,  
Neisseria „nepretențioase” și Veillonella,  
Haemophilus vaginalis,  
Specii de Candida,  
Micobacterii saprofite,  
Specii de Mycoplasma.

Lactobacillus acidophilus (bacilul Döderlein) este bacteria normal predominantă a florei vaginale de la pubertate până la menopauză; prin pH-ul acid pe care îl creează antagonizează restul florei bacteriene. Prezența sa este influențată de hormonii genitali care controlează depunerile de glicogen la nivelul celulelor epitelului vaginal, existând o variație numerică în funcție de vîrstă, în sarcină și chiar în cursul ciclului menstrual (absent imediat după menstruație, crește progresiv spre sfîrșitul ciclului).



Diagnosticul bacteriologic al infecțiilor căilor genitale inferioare (regiune normal contaminată).

Infecțiile la acest nivel evoluează cel mai frecvent ca vulvo-vaginite.

Recoltarea produsului patologic se efectuează pe masa ginecologică după toaletă externă urmată, la pacientele cu exsudat vaginal abundent, de spălătură vaginală. Subliniem că atât spălătura externă cât și cea vaginală, mai ales, trebuie făcute cu irigator steril și apă sterilă iar excesul de apă îndepărtat prin tamponare cu comprese sterile. Produsul se va recolta cu ajutorul tamponului folosind valve sterile, fără urme de antisep-tice sau lubrefiant.

- Dacă există ulcerații, eroziuni, zone hemoragice, recoltarea se face din zonele de afectare maximă;

- în absența acestora, din zona cea mai înaltă a mucoasei vaginale - fundul sac posterior sau din orificiul extern al colului (mai ales în suspiciunea de infecție gonococică).

Pentru recoltare se folosesc 3 tampoane:

- unul dintre ele va fi imediat descărcat într-un volum mic de ser fiziologic steril și va servi pentru diagnosticul microscopic al trichomonazei vaginale (vezi cursul de parazitologie);

- din al doilea tampon se vor efectua 3 frotiuri care vor fi colorate Gram (pentru urmărirea



bacteriilor) și cu albastru de metilen (pentru urmărirea reacției celulare), al treilea frotiu rămâne în rezervă, necolorat;

- al treilea tampon, în suspiciunea de infecție gonococică, va servi pentru însămînțare.

Examenul microscopic. În infecția mucoasei vaginale, pe frotiul colorat cu albastru de metilen (preferabil Giemsa) se evidențiază polinucleare abundente și celule epiteliate profunde de descuamație. Frotiul colorat Gram poate stabili în unele cazuri diagnosticul etiologic. Astfel:

- prezența de diplococi gram-negativi care „burează” polinuclearele este aspectul patognomic pentru infecția gonococică acută;

- pentru candidoza vaginală pledează prezența de celule levuriforme, sferice sau ovoide, și în special a formelor pseudomiceliene gram-pozitiv dominante numeric în raport cu restul florei;

- în infecția cu H. vaginalis este deosebit de tipic numărul mare de bacili scurți gram-negativi formând cîmpuri aproape compacte; în frotiu predomină celulele epiteliale de descuamație și nu polinuclearele.

### Cultura

Intrucît la femeie în infecția gonococică examenul microscopic este foarte rar pozitiv, diagnosticul se pune cu mult mai multe șanse prin însămînțarea probei de exsudat vaginal pe mediul Mueller-Hinton selectiv (prin adăug de lincomicină, colimi-



cină și nistatin, antibiotice fără acțiune asupra gonococului, dar acive față de flora de asociație). Plăcile însămînțate se incubează 24-48 ore la 37°C în atmosferă cu 5-10% bioxid de carbon, saturată în vapori de apă (pentru identificarea gonococului vezi capitolul 12, p.157).

Vaginitele cu Trichomonas vaginalis, H.vaginalis și cele micotice pot fi diagnosticate prin examen microscopic. Pentru infecția gonococică, rar diagnosticată microscopic, este necesară izolarea și identificarea gonococului.

Diagnosticul bacteriologic al infecțiilor căilor genitale superioare (zonă normal sterilă).

Infecțiile căilor genitale superioare survin în urma însămînțării, cel mai frecvent ascendente, a mucoasei uterine cu bacterii patogene sau condiționat patogene aerobe sau anaerobe; de la nivelul endometrului infecția se poate extinde la trompă, ovar, în formele grave putînd determina pelvipерitonite, peritonite generalizate și septicemii. Cele mai severe sînt infecțiile post-abortum și post-partum. Bacteriile cel mai frecvent implicate în aceste infecții sînt: Streptococcus pyogenes, Clostridium perfringens, Escherichia coli, enterococii, stafilococul auriu, streptococii anaerobi, specii de Bacteroides.

Produsele patologice supuse examenului bacte-



riologic sînt reprezentate de:

- secreții uterine sau produse de chiuretaj,
- puroi extras prin punționarea fundului de sac Douglas,
- fragmente de țesut sau puroi recoltate intraoperator,
- sînge.

Pentru a evita contaminarea primelor 2 categorii de produse cu floră vaginală în cursul recoltării, recolta se va face după toaleta atentă a vaginului cu apă sterilă și irigator steril.

Hemocultura și examenul bacteriologic al puroiului recoltat intraoperator sau prin punție se bazează pe metodologia consemnată în capitolele 26, 27.

Produsul de chiuretaj va fi mojarat steril cu o mică cantitate de ser fiziologic și va servi:

- pentru efectuarea unui frotiu colorat [Gram,
- pentru însămînțarea pe medii de cultură;
- eventual pentru inoculare la animal.

Examenul microscopia al frotiului din produsul de chiuretaj poate pune în evidență una, două sau chiar trei morfologii, infecția fiind mixtă mai ales în avortul septic.

Cînd în frotiu este prezentă o floră deosebit de variată, de cele mai multe ori este vorba de o contaminare la recoltare cu floră vaginală sau produsul a fost supus cu întîrziere examenului bacteriologic. Intrucît în acest caz rezultatele sînt



greu interpretabile sau chiar eronate, proba nu se prelucrează în continuare.

Cultura va fi efectuată pe 2 plăci cu geloză sînge incubate aerob și anaerob, epuizarea făcîndu-se prin metoda care permite o apreciere semicantitativă a florei prezente (aceeași schemă de epuizare ca și pentru spută, vezi fig.56). Fiind un produs dintr-o zonă normal sterilă, se recurge, cînd densitatea bacteriilor o permite, și la efectuarea antibiogramei pe cultură primară în condiții aerobe și anaerobe.

În cazul în care în frotiu sînt prezenți bacili gram-pozitivi sugerînd clostridii, produsul va fi inoculat intra-muscular la 1-2 cobai.

Bacteriile izolate din produsele recoltate intraoperator sau în hemocultură vor fi considerate drept agenți etiologici ai infecției prezente.

Pentru produsele din cavitatea uterină, care ~~trăiesc~~ o zonă normal contaminată în momentul recoltării, se vor lua în considerație numai izolații dominanți aerobi sau anaerobi.

La indicația expresă a clinicianului, examenul bacteriologic al produselor provenite din sfera genitală la femeie va fi condus pentru stabilirea diagnosticului de infecție cu Listeria monocytogenes (vezi capitolul 16, p.196), Mycoplasma hominis (vezi capitolul 23, p.226), sau Mycobacterium tu-



berculosis\*) (vezi capitolul 21, p.213).

./.

---

\*) M.tuberculosis va fi cercetat în produsul de  
raclaj uterin, sînge menstrual sau diferite exsu-  
date recoltate prin puncție; sîngele menstrual va  
fi imediat supus hemolizei cu apă distilată și  
trimis la laborator.



## A N E X A

### PREPARAREA COLORANȚILOR ȘI REACTIVILOR NECESARI COLORĂRII BACTERIILOR

#### Prepararea soluțiilor alcoolice saturate ale coloranților bazici

Colorant (de exemplu, albastru de metilen, violet de gențiană sau fucsină bazică)	10 g
Alcool etilic 96°	100 g

Se mojarază colorantul, se adaugă o parte din alcool și se continuă mojararea. Se transvazează într-o sticlă cu dop rotund. Restul alcoolului se adaugă treptat, în porțiuni mici, pentru a spăla colorantul din mojar, fiecare porțiune transvazându-se apoi în sticlă. Se menține sticla la 37°C timp de 7 zile cu agitare ocazională. Se filtrează prin hîrtie. Filtratul reprezintă soluția alcoolică saturată a colorantului.

#### Prepararea soluțiilor de lucru

##### Prepararea soluției de albastru de metilen Loeffler

Sol. alcoolică saturată de albastru de metilen	30 ml
Soluție 1% KOH	1 ml
Apă distilată	100 ml

Se folosește pentru colorații simple sau pentru recolorare în colorația Ziehl-Neelsen.

##### Prepararea soluției de violet de metil

Violet de metil	0,2 g
Apă distilată	100 ml

Se filtrează prin hîrtie.

Se folosește în colorația Gram. Pentru colorația Gram se mai pot folosi, cu rezultate mai puțin bune, și violet de gențiană



sau cristal violet.

Prepararea soluției de fucsina fenolată Ziehl

Sol.alcoolică saturată  
de fucsina bazică 10 ml  
Sol.5% fenol în apă  
distilată 100 ml  
Se filtrează prin hîrtie.

Se folosește în colorația Ziehl-Neelsen. Această soluție diluată 1/10 cu apă distilată se folosește pentru colorații simple sau pentru recolorare în colorația Gram.

Prepararea soluției Lugol

Iod sublimat 1 g  
Iodură de potasiu 2 g  
Apă distilată 200 ml

Se solvă iodura de potasiu în cea 20 ml apă, se adaugă și se solvă iodul, apoi se adaugă restul de apă.

Se folosește ca mordant în colorația Gram.

Prepararea amestecului decolorant alcool-acetonă

Alcool etilic 96° 3 vol.  
Acetonă 1 vol.

./.



## BIBLIOGRAFIS SELECTIVA

### PARTEA INTIIA

#### Capitolul 1

- CHUICKSHANK R. (1965): Medical Microbiology a Guide to The Laboratory Diagnosis and Control of Infection, ed.XI-a, E.& S. Livingstone Limited, Edinburgh and London, capitolul 46.
- SCHMIDT J., NAUMANN G., HORSCH W. (1968): Sterilisation, Desinfektion und Entwesung in der medizinischen und pharmazeutischen Praxis einschliesslich Herstellung von Injektionsarzneien, VEB Georg Thieme, Leipzig.
- SPHOSSIG M., ANGER G. (1972): Mikrobiologisches Vademecum, ed.II-a, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, pp. 62-75.
- SYMPOSIUM (1967): Radiosterilization of Medical Products. Proceeding of a Symposium, Budapest, 5-9 June 1967, I.A.E.A., Vienna.

### PARTEA A DOUA

#### Capitolul 2

- RICHARDS O.W. (1971): Microscopy, in Manual of Clinical Microbiology ed.de Blair J.E., Lennette E.H., Truant J.P., Am.Soc.Microbiol., Bethesda.
- BAILEY W.R., SCOTT E.G. (1974): Diagnostic Microbiology, C.V. Mosby Company, Saint Louis, pp. 9-15.

#### Capitolele 3 si 4

- BITTNER J. (1975): Metodă simplă pentru realizarea condițiilor de anaerobioză generală. Microbiologia (București), 20, pp. 55-62.
- COHAN S.T., STEEL K.J. (1966): Identification of Medical Bacteria, Cambridge University Press.
- PIECH TH. (1971): Identification des Bactéries, in Cours de Microbiologie Systématique de l'Institut Pasteur (Paris), lección 18.
- MESROBEANU L., PAUNESCU E. (1960): Fiziologie bacteriană, Ed.Academiei R.P.R., București.



### Capitolul 5

- DUMAS J. (1953): Les animaux de laboratoire. Anatomie, particularités physiologiques, hématologie, maladies naturelles, experimentation, Ed. Flammarion, Paris.
- HOFFMAN G. (1961): Abriss der Laboratoriumstierkunde, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena.
- MORIS F. (1971): Experimentation sur les animaux de laboratoire în Cours de Microbiologie Systématique de l'Institut Pasteur (Paris), lecția 16.

### PARTEA A TREIA

#### Capitolele 6 și 7

- DUCA E. (1974): Microbiologie Medicală, Ed. Didactică și Pedagogică, București, capitolele XVII, XX-XXII.
- DUCA E., BERNESCU E. (1976): Propuneri privind standardizarea serodiagnosticului sifilisului. Rev. Med. Chir. (Iași), nr. 3, pp. 457-467.
- Ibid. nr. 4, pp. 611-619.
- DUCA M., DUCA E., BERNESCU E., MOROSANU V. (1976): Criterii pentru utilizarea unei tehnici unice de fixare a complementului în serodiagnosticul bolilor infecțioase, Rev. Med. Chir. (Iași), nr. 2, pp. 283-292.
- FAURE M., PAUTRIZEL R., LE MINOR L. (1965): Cum interpretăm reacțiile serologice practicate în bolile infecțioase și parazitare, Ed. Medicală, București.
- STAUB A.M., RAYNAUD M. (1971): Cours d'Immunologie Générale et de Sérologie de l'Institut Pasteur (Paris), Ed. C.D.U., Paris, fascicula III.

### PARTEA A PATRA

#### Capitolele 8 și 9

- BAILEY W.R., SCOTT E.G. (1974): Diagnostic Microbiology, C.V. Mosby Company, Saint Louis, pp. 313-332.



- BALS M. (1976): Testarea sensibilității germenilor la antibiotice. *Viața Medicală*, 23, pp. 207-209.
- BALS M. (1976): *Terapia Infecției*, ed.II-a, Ed.Medicală, București, pp. 294-342.
- DUCA E., BERNESCU E. (1970): Circulația factorilor de rezistență la antibiotice. Implicații practice privind antibiograma și antibioterapia. *Rev.Med.Chir.(Iași)*, nr.3, pp. 792-797.
- GARROD L.P., WATERWORTH P.M. (1971): A study of antibiotic sensitivity testing with proposals for simple uniform methods. *J.clin.Path.*, 24, pp. 779-789.
- O.M.S. (1961): Sér.rapp.techn. No.210. Standardisation de la méthodologie des tests de sensibilité bactérienne. Deuxième rapport du Comité d'experts des antibiotiques, Genève.
- STOKES E.J. (1968): *Clinical Bacteriology*, ed.III-a, E.Arnold, London, capitolul 7.
- WELSCH M. (1965): Cum interpretăm analizele bacteriologice și probele de sensibilitate la antibiotice, Ed. Medicală, București, capitolul IV.

#### PARTEA A CINCEA

Manuale și tratate consultate pentru capitolele 10-23

- BAILEY W.R., SCOTT E.G. (1974): *Diagnostic Microbiology*, C.V. Mosby Company, Saint Louis, capitolele 16-30.
- BERGEY'S *Manual of Determinative Bacteriology*, ed.VIII-a, The Williams & Wilkins Company, Baltimore, 1975.
- BLAIR J.E., LENNETTE E.H., TRUANT J.P. (1971): *Manual of Clinical Microbiology*, Am.Soc.Microbiol., Bethesda, capitolele 5-36.
- BUTTIAUX R., BEERENS H., TACQUET A. (1969): *Manuel de Techniques Bactériologiques*, ed.III-a, Ed. Flammarion, Paris, partea 3-a, capitolele 1-17.
- DUCA E. (1974): *Microbiologie Medicală*, Ed.Didactică și Pedagogică, București, capitolele 23-36.



- INSTITUT PASTEUR (PARIS) (1971): Cours de Microbiologie Systématique de l'Institut Pasteur (Paris), leçons 22-93.
- IOAN C.L., MUNTEANU-IVANUS N., IOAN C. (1973): Diagnosticul de laborator al bacteriilor patogene, Ed. Medicală, București.
- NESTORESCU N. (1965): Bacteriologie Medicală, Ed. Medicală, București, partea a 3-a.
- SPRÖSSIG M., ANGER G. (1972): Mikrobiologisches Vademekum, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, capitolele 2.1.2-2.1.9. și 2.2.
- STOKES E.J. (1968): Clinical Bacteriology, ed. III-a, E. Arnold, London, capitolul 5.

#### Capitolul 10

- BLAIR J.E. (1962): What is a Staphylococcus. Bact. Rev., 26, (375-381).
- MARSIK F.J., PARISI J.T. (1973): Significance of S. epidermidis in the clinical laboratory. Appl. Microbiol., 25, pp. 11-14.
- POPOVICI M., GRECEANU V., ALEXENCO E., VIANU I., IONESCU-CALIN C. (1973): Staphylocoques blancs, coagulase-négatifs, isolés dans des processus infectieux chez l'homme. Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol., 31, pp. 61-67.

#### Capitolul 11

- DEIBEL R.H. (1964): The Group D Streptococci. Bact. Rev., 28, pp. 330-366.
- LORIAN V., POPOOLA B. (1972): Pneumococci producing  $\alpha$ -hemolysis on agar. Appl. Microbiol., 24, p. 44.
- WANNAMAKER L.W. (1970): Group A Streptococcus. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig., 214, pp. 293-297.

#### Capitolul 12

- BERGER U. (1963): Die anspruchlosen Neisserien. Ergeb. Mikrobiol. Immunitätsforsch. exp. Therap., 36, pp. 97-167.
- PEACOCK W.L., WELCH B.G., MARTIN J.E. Jr., THAYER J.D. (1968): Fluorescent antibody technique for identification of presumptively positive gonococcal cultures. Publ. Hlth Rep., 82.



pp. 337-339.

### Capitolul 13

BROWN C., SEIDLER R.J. (1973): Potential pathogens in the environment: *Klebsiella pneumoniae*, a taxonomic and ecological enigma. *Appl. Microbiol.*, 25, pp. 900-904.

FALLON R.J. (1973): The relationship between the biotype of *Klebsiella* species and their pathogenicity. *J. clin. Path.*, 26, pp. 523-528.

RUSU V. (1970): *Yersinia enterocolitica* în patologia umană. *Microbiologia (București)*, 15, pp. 11-38.

### Capitolul 14

GARDNER P., GRIFFIN W.B., SWARTZ M.N., KUNZ L.J. (1970): Non-fermentative gram-negative bacilli of nosocomial interest. *Amer. J. Med.*, 48, pp. 735-749.

PEDERSEN M.M., MARSO M.A., PICKETT M.J. (1970): Nonfermentative bacilli associated with man. III. Pathogenicity and antibiotic susceptibility. *Am. J. Clin. Path.*, 54, pp. 178-192.

PICKETT M.J., MANCIARK C.R. (1970): Nonfermentative bacilli associated with man. I. Nomenclature. *Am. J. Clin. Path.*, 54, pp. 155-163.

PICKETT M.J., PEDERSEN M.M. (1970): Nonfermentative bacilli associated with man. II. Detection and identification. *Am. J. Clin. Path.*, 54, pp. 164-167.

### Capitolul 16

BARKSDALE L. (1970): *Corynebacterium diphtheriae* and its relatives. *Bact. Rev.*, 34, pp. 378-422.

GRAY M.L., KILLINGER H.H. (1966): *Listeria monocytogenes* and Listeric Infections. *Bact. Rev.*, 30, pp. 309-382.

MEITERT E., SARAGEA A. (1967): Utilizarea mediului Tinsdale în diagnosticul bacteriologic al difteriei. *Microbiologia (București)*, 12, pp. 361-368.



Capitolul 17

MOUSTARDIER G. (1972): Bactériologie Médicale, Librairie Maloine, Paris, capitolul 9.

Capitolul 18

ARDELEANU J., TEBDORESCU I. (1974): Studiul unei tulpini de *Clostridium tetani* izolată de la un caz de avort septic. *Microbiologia* (București), 19, pp. 137-142.

Capitolele 19 și 20

SCHOUTENS E., ISTRASSOWSKY (1974): Septicémies à *Bacteroides fragilis*. *Gaz.Med. France*, 81, pp. 1363-1372.

WILSON W.R., MARTIN W.J., WILKOWSKY C.J., WASHINGTON J.A. (1972): Anaerobic bacteremia. *Mayo Clin. Proceedings*, 47, pp. 639-646.

ZBRANSKY R.J. (1970): Isolation of anaerobic bacteria from clinical specimens. *Mayo Clin. Proceedings*, 45, pp. 256-263.

Capitolul 21

ALGEORGE G., BOBANESCU V. (1965): Investigația bacteriologică în cadrul depistării și combaterii tuberculozei, în vol. Elemente de combatere și eradicare a tuberculozei, ed.de Bulla IL., Ed.Medicală, București, pp. 192-249.

DELBRYNE J. (1971): Bactériologie et classification des infections humaines à mycobactéries. *Gaz.Med. France*, 78, pp. 1305-1311.

KUBICA G.P. (1973): Differential identification of *Mycobacteria* VII. Key features for identification of clinically significant *Mycobacteria*. *Am.Rev.Resp.Dis.*, 107, pp. 9-18.

STOKES E.J. (1968): *Clinical Bacteriology*, ed.III-a, E.Arnold, London, pp. 111-159.

Capitolul 22

O.M.S. (1967): Sér.rapp.techn. No.380. Problèmes actuels des recherches sur la leptospirose, Genève.

O.M.S. (1970): Sér.rapp.techn. No.455. Recherches sur les tréponé-



matoses, Genève.

SPARLING P.F. (1971): Diagnosis and treatment of syphilis. N.Engl.J.Med., 284, pp.642-654.

### Capitolul 23

ALUALTO B.B., WITTLER R.G., WILLIAMS C.O., FABER J.E. (1970): Standardized bacteriologic techniques for the characterization of Mycoplasma species. International J.of Syst.Bact., 20, pp. 35-58.

PEROL I., IATRILLE J. (1975): Diagnostic biologique des infections humaines à mycoplasmes. Med.Mal.Inf., 5, pp. 265-276.

SOLOMON F., CASPI E., BUKOVSKY I., SOMPOLINSKY D. (1973): Infections associated with genital Mycoplasma. Am.J.Obstet. Gynec., 116, pp. 785-792.

### PARTEA A SASEA

Manuale și tratate consultate pentru capitolele 24-33

BAILEY W.R., SCOTT E.G. (1974): Diagnostic Microbiology, C.V. Mosby Company, Saint Louis, capitolele 6-15.

BLAIR J.E., LENNETTE E.H., TRUANT J.P. (1971): Manual of Clinical Microbiology, Am.Soc.Microbiol., Bethesda, capitolele 2-11.

BUTTIAUX R., BEERENS H., TACQUET A. (1969): Manuel de Techniques Bactériologiques, ed.III-a, Ed. Flammarion, Paris, partea 2-a, capitolele 1-10, 14.

ROSEBURY T. (1962): Microorganisms Indigenous to Man, McGraw-Hill Book Company, Inc., New York.

STOKES E.J. (1968): Clinical Bacteriology, ed.III-a, E.Arnold, London, capitolele 3,4,6.

WEISCH M. (1965): Cum interpretăm analizele bacteriologice și probele de sensibilitate la antibiotice, Ed.Medicală, București.



#### Capitolul 24

- BODILY H.L. (1970): General Administration of the Laboratory, in Diagnostic Procedures for Bacterial, Mycotic and Parasitic Infections ed.de Bodily H.L., Updyke E.L., Mason J.O., Am. Public Hlth Assoc., Inc., New York, capitolul 1.
- CARY S.G., BLAIR E.B. (1964): New transport medium for shipment of clinical specimens. J.Bact., 88, pp. 96-98.
- STUART R.D. (1959): Transport medium for specimens in public health bacteriology. Publ.Hlth Rep., 74, pp. 431-438.

#### Capitolul 25

- BARTLETT R.C. (1974): A plea for clinical relevance in medical microbiology. Am.J.Clin.Path., 61, pp. 867-872.
- BILBIIE VL. (1972): Delimitări biologice și ecologice în conceptul de patogenitate condiționată. Microbiologia (București), 17, pp. 5-14.
- DUCA E., BUIUC D. (1970): Bacterii potențial patogene. Rev.Med. Chir.(Iași), nr.3, pp. 767-777.
- DUCA E. (1971): Valoarea practică a reacțiilor serologice în diagnosticul bolilor infecțioase. Viața Medicală, 18, pp.1045-1052.
- DUCA E. (1972): Factori și mecanisme care favorizează apariția infecțiilor cu bacterii și fungi condiționat patogeni. Microbiologia (București), 17, pp. 23-30.
- POPOVICI M. (1972): Bacterii cu patogenitate condiționată. Probleme ale diagnosticului de laborator. Criterii de diferențiere. Ibid., pp. 15-22.

#### Capitolul 26

- BENNETT I.L., PETERSDORF R.G. (1971): An approach to infectious diseases, in Harrison's Principles of Internal Medicine, ed.VI-a, Mc Grow-Hill Book Company, New York, capitolul 132.
- CLUFF L.E., FEKETTY F.R. (1971): Bacterial endocarditis, ibid., capitolul 137.
- ROSENFELD M.G. (1971): Manual of Medical Therapeutics, ed.IX-a,



Little Brown & Company, Boston, pp. 247-248.

### Capitolul 27

DUCA E., BERNESCU E., BUIUC D., BIRZU A., NICULESCU N., PAPALICEFF ST., NITESCU S. (1974): Primary sensitivity tests as a method for the isolation of organisms in polybacterial specimens/experimented in burn wounds. Rev.Med.Chir. (Iasi), nr.1, pp. 85-90.

ROE E., JONES R.J., LOWBURY E.J.L. (1971): Transfer of antibiotic resistance between *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, and other gram-negative bacilli in burns. Lancet, 1, pp. 149-152.

ROSEMBLATT J.E., FALLON A., FINEGOLD S.M. (1973): Comparison of methods for isolation of anaerobic bacteria from clinical specimens. Appl.Microbiol., 25, pp. 77-85.

### Capitolul 28

COONROD J.D., RYTEL M.W. (1973): Detection of type-specific pneumococcal antigens by counterimmunoelectrophoresis. I. Methodology and immunologic properties of pneumococcal antigens. J.Lab.Clin.Med., 81, pp. 770-777.

DUCA E. (1967): Explorarea microbiologică a lichidului cefalorahidian. Viața Medicală, 14, pp. 1107-1120.

GREENWOOD B.M., WHITTLE H.C., DOMINIC-RAJKOVIC O. (1971): Countercurrent immunoelectrophoresis in the diagnosis of meningococcal infections. Lancet, 2, 519-521.

KOSTYUKOVA N.N. (1975): Diagnosticul microbiologic al infecțiilor meningococice. Microbiologia (București), 20, pp.245-248.

SMITH AL. (1973): Diagnosis of bacterial meningitis. Pediatrics, 52, pp. 589-592.

### Capitolul 29

DUCA E., BUIUC D. (1976): Aportul laboratorului de microbiologie în investigația reno-urinară. Examenul bacteriologic al urinei. Microbiologia (București), 21, sub tipar.



Capitolul 30

- BELLIVEAU R.R. (1973): Normal vs patogenia flora in acute pharyngitis. N.Engl.J.Med., 288, 797.
- KAPLAN E.L., TOP F.H.Jr., DUDDING B.A., WANNAMAKER L.W. (1971): Diagnosis of streptococcal pharyngitis: differentiation of active infection from the carrier state in the symptomatic child. J.Inct.Dis., 123, pp. 490-502.
- MIHALCU F. (1969): Diagnosticul de laborator al infecțiilor cu streptococ  $\beta$ -hemolitic. Microbiologia (București), 14, pp. 459-468.
- SARAGA A., MERTERT E., MAXIMESCU P. (1967): Unele modificări ale metodei de diagnostic bacteriologic în difterie. Microbiologia (București), 12, pp. 369-376.

Capitolul 31

- BARTLETT R.C. (1974): A plea for clinical relevance in medical microbiology. Am.J.Clin.Path., 61, pp.867-872.
- HOEPRICH P.D. (1970): Etiologic diagnosis of lower respiratory tract infections. Californ.Med., 112, pp. 1-8.
- KALINSKE R.W., PARKER R.H., BRANDT D., HOEPRICH P.D. (1967): Diagnostic usefulness and safety of transtracheal aspiration. N.Engl.J.Med., 276, pp. 604-608.
- KESTLE D.G., KUBICKI E.P. (1967): Sputum collection for cultivation of mycobacteria. Am.J.Clin.Path., 48, pp. 347-349.
- MUPSON M.A., KRAUSE E.E., MOCEGA H.E., DAWSON F.W. (1970): Viruses, Mycoplasma pneumoniae and bacteria associated with lower respiratory tract disease among infants. Am.J.Epidem., 91, pp. 192-202.
- PECORA D.V. (1963): A comparison of transtracheal aspiration with other methods of determining the bacterial flora of the lower respiratory tract. N.Engl.J.Med., 269, pp. 664-666.
- SEFER M., TATARU V., SZEGLI L., NEGUT M., STOICA V. (1971): Microorganisme izolate din secreția bronșică și semnificația lor. Microbiologia (București), 16, pp. 531-538.



Capitolul 32

DU PONT H.L., FORMAL S.B., HORNICK R.B., SNYDER M.J., LIBONATI J.P., SHEAHAN D.G., LA BREC E.H., KALAS J.P. (1971): Pathogenesis of *Escherichia coli* diarrhea. *N.Engl.J.Med.*, 285, pp. 1-9.

FLORESCU D.P. (1974): Noi agenți etiologici ai enteritelor dizenteriforme. Teză de doctorat, I.M.F. București.

JOSAN R., BILCEA M., SUCIU O., CAVRILA I. (1970): Rolul germinilor potențial patogeni în enteritele copiilor. *Microbiologia* (București), 15, pp. 333-338.

POPOVICI M., SZEGLI L., GEORGESESCU C., NAGESCU N., DUMITRESCU R. (1973): Importanța diagnosticului etiologic în tulburările intestinale acute (boala diareică). *Microbiologia* (București), 18, pp. 359-364.

SERRAN D., IVANOF A., MUNTRANU I. (1973): Rolul klebsiелеi în enterita copilului în relație cu cantitatea de germeni. *Microbiologia* (București), 18, pp. 203-210.

Capitolul 33

CIUCA T. (1972): Leucoreea la fete și la pubertate. *Obstetr. Ginecol.*, 20, pp. 453-467.

DUMKELBERG W.E. (1965): Diagnosis of *Haemophilus vaginalis* vaginitis by gram-stained smears. *Am.J.Obstet.Gynec.*, 91, pp. 998-1000.

GORBACH S.L., MENDE K.B., THADEPAILLI H., KEITH L. (1973): Anaerobic microflora of the cervix in healthy women. *Am.J.Obstet.Gynec.*, 117, pp. 1053-1055.

SWEET R.L., LEDGER W.J. (1973): Puerperal infections morbidity. *Am.J.Obstet.Gynec.*, 117, pp. 1093-1100.

79-84  
886

./.



# ① Principali constituenți ionici ai plasmei sanguine

$\text{Na}^+$	limite normale	- 135 - 155 mEq/l
$\text{K}^+$	- " -	3,5 - 5,5 mEq/l
$\text{Ca}^{2+}$ (total)	- " -	4,5 - 5,5 mEq/l ( $\text{Ca}^{2+}$ 50% din cel total)
$\text{Mg}^{2+}$	- " -	1,5 - 2,9 mEq/l
$\text{Cl}^-$	- " -	98 - 108 mEq/l

În laboratorul nostru, determinarea  $\text{Na}$  și  $\text{K}$  se face prin fotometria cu flacără;  $\text{Ca}$  &  $\text{Cl}$  prin titrare, iar uneori și prin dozare colorimetrică cu galben de titan.

Tulburările hidroelectrolitice sunt de obicei acute, cu sau fără substrat patologic care, poate, provine din carență sau exces.

$\text{Na}^+$ ; crește - în ciroză hep., nefroză, insuficiență cardiacă;  
scade - în diace, vărsături, insuficiență renală-pancreatită

$\text{K}^+$  = crește - insufic. renală, socul hemoragic & traumatic;  
scade - stenoză pilorică, cetoză diabetică

$\text{Ca}$  = crește - hiperparatiroidism, carcinom, hipervitaminoză D;  
scade = Boala Celiacă, insufic. renală, hipoparatiroidism